

## Revisión de la Hidroxiapatita Nanoestructurada como Alternativa para Tratamiento de Cáncer

### Overview of Nanostructured Hydroxyapatite as an Alternative to Treat Cancer

V. Rodríguez-Lugo <sup>a</sup>, D. Salado-Leza <sup>b,\*</sup>, S. López-Ortiz <sup>a</sup>, D. Mendoza-Anaya <sup>c</sup>, L. S. Villaseñor-Cerón <sup>a</sup>, M. I. Reyes-Valderrama <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Pachuca, Hidalgo, México.

<sup>b</sup> Cátedras CONACYT, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México.

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750, Ocoyoacac, Estado de México, México.

#### Resumen

La hidroxiapatita nanoestructurada (nano-Hap) surge como una potente herramienta biomimética para mejorar el desempeño de las terapias convencionales contra el cáncer. Su composición química, textura y capacidad de dopaje, así como su compatibilidad, estabilidad y actividad en sistemas biológicos la hacen una candidata excepcional para el desarrollo de vehículos para la entrega selectiva de fármacos antineoplásicos. La presente revisión va dirigida a estudiantes e investigadores del área de materiales avanzados, con la intención de introducirlos en la importancia de explorar de manera interdisciplinaria las propiedades intrínsecas y adquiridas de los nanomateriales en beneficio de la sociedad, principalmente para ciencias de la salud. Con un propósito formativo, presentamos generalidades de la síntesis, caracterización y evaluación toxicológica *in vitro* de la nano-Hap para, finalmente discutir los avances más relevantes en el área del 2016 a la fecha. Concluimos incentivando a la comunidad al trabajo colaborativo interdisciplinario para innovar en Nanomedicina con materiales que permitan mejorar el desempeño de los protocolos oncológicos existentes.

#### Palabras Clave:

Hidroxiapatita, Hidroxiapatita dopada, Funcionalización, Toxicidad, Liberación de fármacos, Tratamiento de Cáncer.

#### Abstract

Nanostructured hydroxyapatite (nano-Hap) emerges as a powerful biomimetic tool to improve the performance of conventional cancer therapies. Its chemical composition, texture and doping capacity, as well as, its compatibility, stability and activity in biological systems make it an exceptional candidate to develop targeted delivery systems for antineoplastic drugs. In this work, we present a brief review intended for students and researchers of the advances materials field with the aim of attracting their attention on the importance of developing and applying novel bionanomaterials for the benefit of human society, particularly in health sciences. With a training purpose, we present an overview of the synthesis, characterization and *in vitro* toxicological evaluation of pure, doped and functionalized nano-Hap, to finally present the most recent advances of the use of nano-Hap to treat malignant cells in a controlled way. We conclude by encouraging the community to innovate in Nanomedicine with materials that allow improving the performance of the existing oncological protocols.

#### Keywords:

Hydroxyapatite, Doped hydroxyapatite, Functionalization, Toxicity, Drug delivery, Cancer treatment.

#### 1. Introducción

La hidroxiapatita (Hap) es un compuesto químico ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) bio -estable, -compatible y -activo similar al hueso; propiedades que la hacen altamente atractiva para

aplicaciones en ciencias de la salud. Por ejemplo, históricamente la Hap ha sido considerada el sustituto predilecto en ortopedia y odontología (Olszta et al. 2007; Li et al. 2008). Más aún, en los últimos años la comunidad científica se ha inspirado en su composición, topografía y morfología para desarrollar Hap

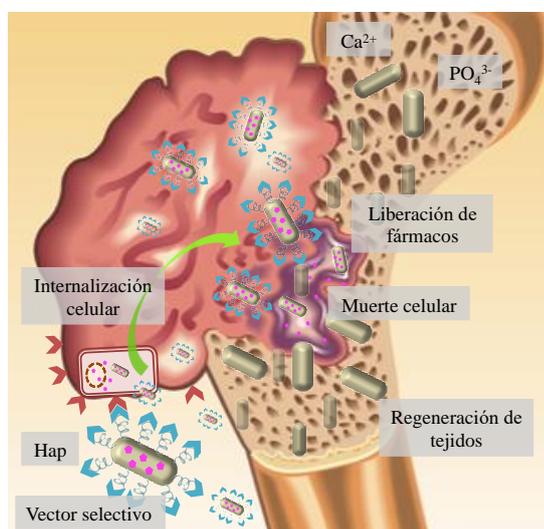
\*Autor para la correspondencia: daniela.salado@conacyt.mx, daniela.salado@uaslp.mx (Daniela E. Salado-Leza)

Correo electrónico: ventura.rl65@gmail.com (V. Rodríguez-Lugo), multimediasusy@hotmail.com (S. López-Ortiz), mendoza6412@gmail.com (D. Mendoza-Anaya), leslysabina@gmail.com (L. S. Villaseñor-Cerón), isareyv@hotmail.com (M. I. Reyes-Valderrama).

nanoestructurada (nano-Hap) para así, ampliar su aplicabilidad a la creación de innovadoras plataformas biomiméticas. Éstas, surgen como alternativa en el tratamiento de diferentes padecimientos; tanto para transportar fármacos y favorecer su entrega selectiva, como para causar daño a células enfermas resultado de su hibridación o dopaje.

Así pues, la nanomedicina es una rama emergente de la nanotecnología dedicada al desarrollo y estudio de nanomateriales (NMs) como herramientas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Las propiedades fisicoquímicas y la versatilidad superficial de los NMs, es el valor agregado de la nanomedicina. Particularmente, los NMs inorgánicos representan un grupo importante de nanoterapéuticos potenciales. Estos poseen propiedades intrínsecas que responden a estímulos externos para desarrollar, por ejemplo, agentes teragnósticos (diagnóstico y terapia simultáneas). Asimismo, pueden ser modificados a través de la funcionalización e hibridación estructural para adquirir características de selectividad y bioseguridad. Es así como, la nano-Hap pura, funcional, dopada y/o bio-conjugada es hoy en día considerada una alternativa alentadora para proponer terapias adyuvantes, es decir, adicionales al tratamiento primario, y disminuir el riesgo de recurrencia del cáncer.

Debido a su similitud con el tejido óseo, se ha estudiado ampliamente el uso de la nano-Hap como vehículo o nanoterapéutico potencial en el tratamiento de cáncer en los huesos (Ficai et al. 2014; Singh, Singh, and Jolly 2020). La **Figura 1** ilustra un osteosarcoma (cáncer primario de huesos largos) recibiendo quimioterapia dirigida basada en nanomedicina con Hap híbrida en forma de rodillos.



**Figura 1: Representación gráfica de un osteosarcoma expuesto a un tratamiento con nano-Hap usada como vehículo para la liberación selectiva de un fármaco. La propiedad de osteo-inducción y -conducción, se ilustra con las varillas de Hap libres de fármaco localizado en el tejido óseo poroso. Modificada de <https://www.redaccionmedica.com/recursos-salud/diccionario-enfermedades/cancer-oseo>.**

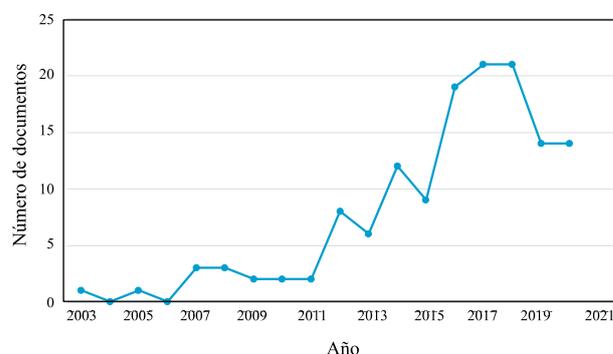
Esta neoplasia maligna primaria es más común en niños y adolescente (56% vs 28% en adultos), poco frecuente considerando todos los tipos de cáncer (< 0.2%) (American Cancer Society) y, la mayoría de las veces su diagnóstico se refiere a metástasis óseas provenientes de tumores en senos, próstata y pulmón. A pesar de que en el pasado los pacientes eran sometidos a una amputación con el objetivo de extirpar el

tumor de manera completa, en la actualidad la conservación de las extremidades es el estándar clínico. Los avances científicos han permitido mejorar el desempeño de los protocolos de diagnóstico oportuno y quimioterapia (Secretaría de Salud, Gobierno de México), lo cual da cabida al desarrollo nanotecnológico como alternativa terapéutica.

Por lo tanto, esta revisión tiene como objetivo reunir información bibliográfica del desarrollo nanotecnológico de Hap como adyuvante en terapias oncológicas convencionales, principalmente contra cáncer en los huesos, sin excluir posibles metástasis óseas, y está dirigida a estudiantes e investigadores del área de materiales avanzados, que puedan o no, tener formación en el campo de la nanomedicina. Igualmente, tiene como propósito presentar, con un nivel adecuado para estudiantes de licenciatura y posgrado, generalidades de las técnicas básicas de síntesis, caracterización y evaluación toxicológica *in vitro* de la nano-Hap.

Para presentar el estado del arte, se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos Scopus de la empresa Elsevier, del trabajo original publicado a partir del año 2016 a la fecha. La búsqueda tuvo como eje principal las siguientes palabras clave en inglés: *i) hydroxyapatite, ii) nanoparticles, iii) toxicity, iv) drug delivery, y v) cancer treatment*, y como principal criterio de exclusión, no se contemplaron trabajos enfocados únicamente a la síntesis y caracterización de los NMs. Asimismo, se priorizaron trabajos con evaluaciones a multi-escala, entendidos como aquellos que conjuntan resultados científicos tanto en modelos celulares como animales, y se presenta la discusión particular, no exhaustiva, de los artículos enfocados en osteosarcoma y cáncer de mama, tanto para Hap pura como funcional y dopada.

Adicionalmente, el **Apéndice A** resume la información más relevante recabada durante el proceso de búsqueda, con el objetivo de ayudar al lector a navegar por esta literatura. La **Figura 2** muestra, a partir del primer año que registra la base de datos (2003), las publicaciones científicas que contienen las palabras clave antes mencionadas, con el objetivo de ilustrar la evolución cronológica de la investigación en el área. Se encontró una tendencia creciente, lo que sugiere un amplio interés y expectativas importantes para la nano-Hap como vehículo de liberación de fármacos para tratamiento de cáncer.



**Figura 2: Número anual de documentos (artículos, revisiones, artículos y capítulos de libros) en nano-Hap para tratamiento de cáncer indexados en Scopus durante el periodo 2003-2020.**

## 2. Métodos de síntesis

En nanotecnología, los métodos de síntesis se entienden como aquellas rutas físicas, químicas o combinadas, que a través de una secuencia ordenada de pasos, permiten obtener NMs con propiedades específicas. Estos se dividen en dos grandes categorías: *i*) top-down y *ii*) bottom-up, las cuales hacen referencia a la fabricación de NMs a partir de micropartículas sometidas a procesos de conminución y al ensamblaje de átomos y moléculas, respectivamente.

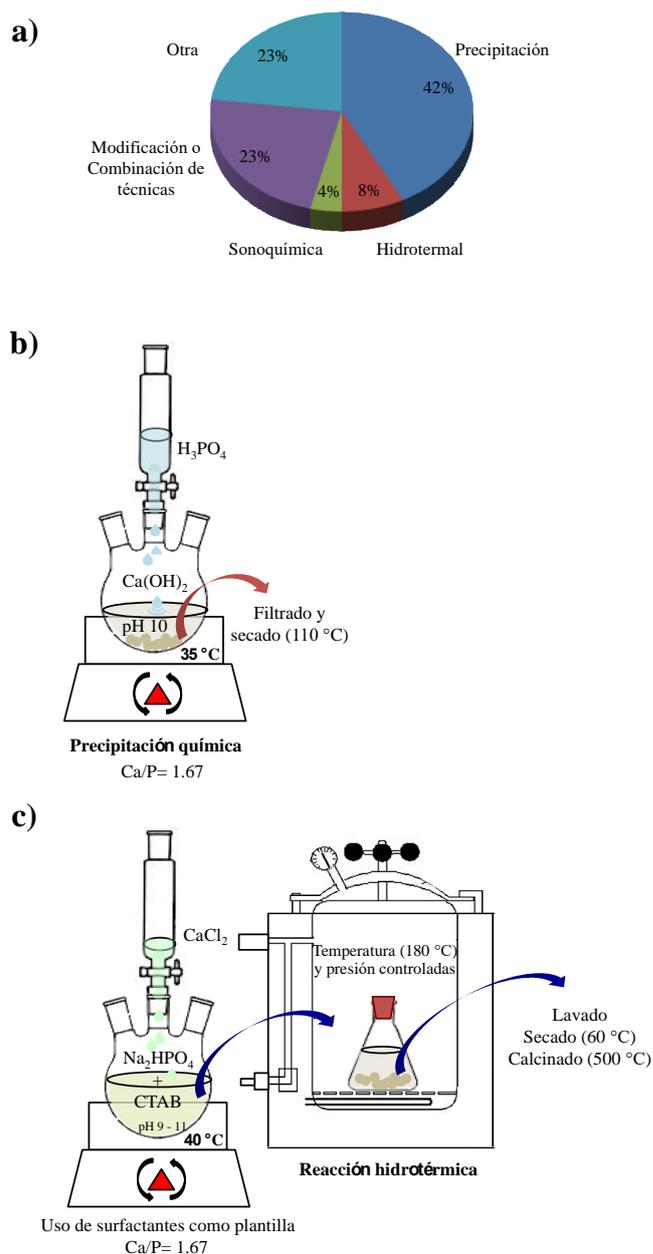
La nano-Hap sintética se obtiene comúnmente siguiendo la estrategia bottom-up en húmedo usando diferentes precursores, es decir, soluciones que contienen los elementos químicos fundamentales de la estructura. Entre los precursores más utilizados de calcio se encuentran:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{CaSO}_4$ ; y de fósforo:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Con el paso de los años se han ido diversificando y modificando los métodos de síntesis de la Hap. Sobresalen las técnicas de precipitación, hidrólisis, sol-gel, hidrotermal, micro-emulsión y sonoquímica (Szcześ, Holysz, and Chibowski 2017; Sadat-Shojai et al. 2013). La **Tabla 1** presenta algunos de los aspectos más relevantes de estas técnicas.

Tabla 1: Generalidades de los métodos de síntesis más comunes de Hap (Sadat-Shojai et al. 2013).

Método	Reactivos	Costo	Morfología	Tamaño
Precipitación	pocos	Bajo	diversa	nano
Hidrólisis	pocos	Alto	diversa	variable
Sol-Gel	variable	Variable	diversa	nano
Hidrotermal	variable	Alto	acicular	nano y micro
Micro-emulsión	muchos	Alto	acicular	nano
Sonoquímica	pocos	Bajo	diversa	nano

A partir de la información recabada, la precipitación química es la técnica más simple y de mayor factibilidad para desarrollar nano-Hap como agente antitumoral (**Figura 3a**). Brevemente, la precipitación química convencional se fundamenta en que, a temperatura ambiente y pH de 4.2, la Hap es la fase de CaP menos soluble y, generalmente la más estable en solución acuosa (Sadat-Shojai et al. 2013). Esta ruta requiere pocos precursores, es decir, una solución ácida de  $\text{PO}_4^{3-}$  y una alcalina de  $\text{Ca}^{2+}$ , que guardan la relación estequiométrica de la Hap (Ca/P 1.67) a temperaturas que van desde la ambiental hasta cercanas al punto de ebullición del agua. La **Figura 3b** esquematiza este procedimiento. A través de esta ruta, se obtiene Hap nanométrica de alta pureza con un mínimo de subproductos, esencialmente agua, siendo también fácilmente escalable. Sin embargo, su cinética puede llegar a comprometer la morfología y cristalinidad del polvo de Hap resultante. No obstante, esta metodología puede ser modificada para controlar las etapas de nucleación, agregación y crecimiento de la nanoestructura. Así pues, se pueden cambiar los parámetros antes mencionados, añadir surfactantes o asistir la reacción con e.g. ultrasonido (Orooji et al. 2020). La reacción de precipitación también permite funcionalizar y dopar la Hap *in situ*, con el propósito de obtener estructuras híbridas con propiedades remarcables para aplicaciones médicas.



**Figura 3. a) Proporción de las principales rutas para sintetizar nano-Hap como alternativa para tratamiento cáncer. Esquemización del proceso experimental de síntesis por los métodos de b) precipitación química y c) reacción hidrotérmica.**

La vía hidrotermal es otro método ampliamente utilizado para la síntesis de nano-Hap. La reacción química se lleva a cabo generalmente en solución acuosa a temperatura y presión elevadas. Esta metodología puede combinarse con la precipitación química o, ser asistida por microondas (Villaseñor-Cerón et al. 2019; Sánchez-Campos et al. 2020), llevando a cabo el tiempo de maduración a temperaturas superiores al punto de ebullición del agua y dentro de un autoclave o frasco a presión. A partir de las condiciones experimentales y uso de aditivos, la vía hidrotermal se utiliza para obtener morfologías tipo rodillo o varilla, promoviendo el crecimiento de la estructura en una dirección específica, y NMs híbridos con una amplia gama de aplicaciones (Ortiz et al. 2017; Rodríguez-Lugo et al. 2018; Mendoza-Anaya et al. 2018; Villaseñor Cerón et al. 2019; Rodríguez Lugo, Castaño, and Rubio-Rosas 2016). La **Figura 3c**

ilustra un protocolo experimental que emplea bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como plantilla, para la síntesis de nano-rodillos de Hap. La Hap obtenida por este método guarda su relación estequiométrica de 1.67 y presenta una alta cristalinidad. Sin embargo, como se resume en la **Tabla 1**, los costos se elevan por las condiciones de reacción.

Adicionalmente, la superficie de la nano-Hap puede ser activada a través de su funcionalización, la cual puede realizarse post-síntesis (*ex situ*) (Cui et al. 2016), es decir, una vez que el cristal ha sido formado (*e.g.* después de ser calcinado), o durante su formación (*in situ*) (Yifan Wang et al. 2016). Principalmente, se utilizan moléculas orgánicas o polímeros para modificar su química y carga superficial su estabilidad coloidal. Asimismo, la funcionalización dotará a la nano-Hap con puntos de anclaje para ser bio-conjugada, permitiendo desarrollar vehículos para la entrega selectiva de medicamentos (Xiong et al. 2018). Por ejemplo, moléculas que contienen el grupo funcional amino ( $\text{NH}_2$ ), tales como el poliacrilato de sodio (PAAS), el 3-aminopropiltrióxido de silano (APS o AMPTES) y el polietilenoimina (PEI), han sido ampliamente utilizados para funcionalizar nano-Hap para aplicaciones oncológicas (**Apéndice A**). A lo largo de esta revisión, se discuten más ejemplos de funcionalización, dopaje e hibridación para clarificar los conceptos, a través de la literatura seleccionada, y presentar el estado del arte del desarrollo de nano-Hap biomimética como alternativa para mejorar las terapias contra el cáncer.

### 3. Caracterización básica de nanoestructuras de Hap

Existe una gran variedad de técnicas analíticas para caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los materiales. Se debe conocer el fundamento teórico de éstas para poder sacar los mayores beneficios científicos y tecnológicos a su uso. A grandes rasgos, cada instrumento cuenta con una fuente que será la encargada de interactuar con la materia para generar una señal, ésta deberá ser detectada y transformada para así, ser entregada al operador. Por ejemplo, la fuente puede ser luz, partículas cargadas, calor, o alguna otra fuerza mecánica. El propósito de esta sección es proporcionar información básica de las principales técnicas utilizadas para caracterizar la nano-Hap, enfatizando en qué información se pretende obtener y en aquellos fenómenos elementales que nos darán la respuesta.

Cuando desarrollamos nanoestructuras por química húmeda, nos interesamos principalmente en conocer la forma y el tamaño de esos objetos que nuestros ojos perciben como una solución homogénea y posiblemente colorida, o como una separación entre las fases sólida y líquida. Cuando se trata de materiales tan pequeños ( $10^{-9}$  m), la luz común (energías del espectro visible electromagnético) no nos permite visualizarla detalladamente. Por lo tanto, debemos utilizar microscopios con fuentes más energéticas y con longitudes de onda tan pequeñas que nos permitan llegar a resoluciones nanométricas. El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) cuenta con una fuente (filamento) que genera un haz primario de electrones (con energías de hasta 30 KeV) para “iluminar” la muestra, y con diferentes detectores se recogen los electrones que se generan de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja sus características superficiales, pudiendo proporcionar información de la forma, textura y composición química de sus constituyentes, en la escala micrométrica y nanométrica. En la microscopía electrónica de transmisión (TEM) el haz de electrones (con energías de hasta 400 KeV) es

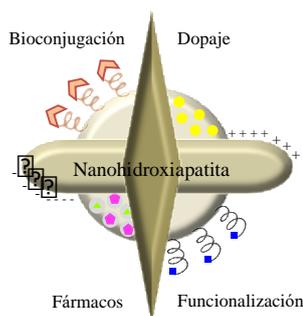
dirigido sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. A través de los electrones transmitidos y difractados, se obtiene información sobre la morfología (tamaño y forma de las partículas) y estructura cristalina del material en estudio; la resolución de esta técnica puede ser hasta del orden de los Armstrong ( $\text{Å} = 10^{-10}$  m). Para la nanomedicina del cáncer, las formas más comunes de nano-Hap reportadas y caracterizadas por SEM y TEM son: aciculares (aspecto similar a agujas), de rodillo o varilla y esférica (**Apéndice A**). Igualmente, fenómenos como la emisión de rayos X característicos, complementan la información analítica de estas técnicas para así, determinar la composición química del espécimen. Las muestras SEM y TEM deben examinarse en seco y al vacío para evitar interferencias con el haz de electrones. Por lo tanto, debido a la preparación de la muestra, ésta pueden llegar a perder información de las moléculas o compuestos orgánicos usados en la funcionalización y bio-conjugación. La criomicroscopía electrónica es una opción para caracterizar los NMs híbridos para aplicaciones biomédicas, preservando las capas orgánicas más sensibles a la radiación con electrones de centenas de kV.

Sin embargo, también podemos estudiar la distribución del tamaño, haciendo incidir fotones de baja energía, generalmente en el rango de la luz roja ( $> 633$  nm), sobre suspensiones de Hap. Por espectroscopia de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) se obtiene la distribución del radio o diámetro hidrodinámico. Brevemente, el movimiento Browniano de partículas o moléculas en suspensión hace que la luz se disperse con diferentes intensidades. Estas fluctuaciones de intensidad, es analizada para obtener la velocidad del movimiento browniano que, a partir de la relación de Stokes-Einstein, es proporcional al tamaño. Por DLS obtenemos la media del tamaño hidrodinámico, es decir, de una esfera rígida hidratada o solvatada, que puede o no contener modificaciones superficiales como polímeros de recubrimiento o bio-moléculas conjugadas. Adicionalmente, los equipos de DLS vienen acoplados a una fuente que permite aplicar un campo eléctrico a la suspensión para estudiar la migración polar de las partículas y así determinar su potencial zeta. Éste, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga superficial) entre partículas, y es fundamental para determinar la estabilidad coloidal de NMs como la Hap biomimética. Particularmente, para aplicaciones en áreas de la salud, es primordial conocer esta propiedad para elucidar posibles efectos e interacciones a multi-escala (en células e *in vivo*) de las nuevas formulaciones nanotecnológicas.

Si volvemos a subir el rango energético, encontramos la técnica de difracción de rayos X (DRX), basada en la dispersión coherente (sin pérdida de energía) de un haz de rayos X de determinada energía (*e.g.* Cu: 2.2 kW, Mo: 3 kW, etc.) al interactuar con los átomos ordenados que forman un material cristalino. A este fenómeno lo describe la Ley de Bragg, la cual relaciona la longitud de onda del haz incidente y la distancia interatómica, con el ángulo del haz difractado. Los difractogramas de rayos X generados por esta técnica, nos proporcionan información para poder identificar y cuantificar los componentes presentes en los materiales cristalinos, ya que para cada material, por ejemplo la Hap, existe un difractograma único.

Finalmente, para tener una caracterización fisicoquímica básica de alguna nano-Hap desarrollada con fines terapéuticos, la química de los grupos funcionales se puede estudiar por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF).

Ésta, tiene su fundamento en la absorción de la radiación IR, de mayor longitud de onda que la luz visible, causando que las moléculas presenten transiciones vibracionales de tensión o flexión. Las primeras, son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos y las segundas, se originan por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. A partir de espectroscopia IR-TF podemos identificar la presencia de grupos funcionales y así, determinar si un NM como la Hap ha sido funcionalizada exitosamente con algún propósito en particular. En resumen, la **Figura 4** esquematiza las principales morfologías, y modificaciones superficiales que puede presentar la nano-Hap para su uso potencial en terapias antitumorales.



**Figura 4:** Esquemática de nanoestructuras híbridas de Hap para aplicaciones biomédicas.

#### 4. Ensayos de toxicidad

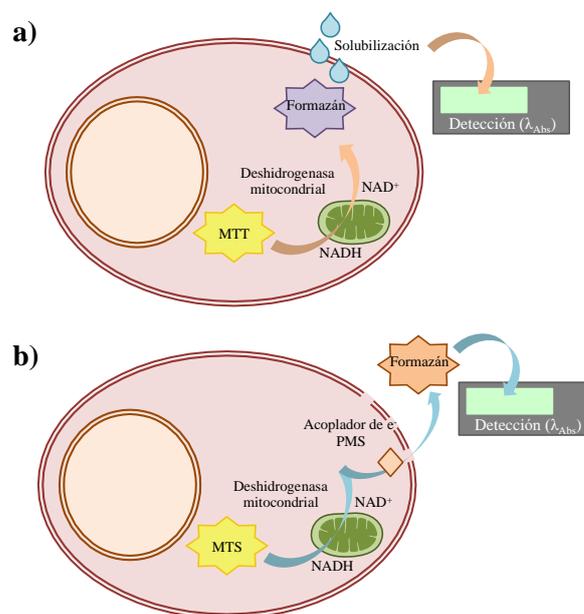
Los métodos convencionales de evaluación toxicológica *in vitro* han sido adaptados para explorar el potencial terapéutico de los NMs. Estos métodos se basan principalmente en la bioquímica celular, usando sondas foto-responsivas para describir el efecto de éstos hacia componentes constitutivos celulares.

Entre los principales ensayos colorimétricos de toxicidad se encuentran aquellos a base de sales de tetrazolio. Su fundamento permite determinar de manera indirecta la viabilidad, proliferación o supervivencia celular, esto dependiendo del enfoque analítico del ensayo. Brevemente, estas sales se reducen por acción de enzimas mitocondriales (deshidrogenasas de la cadena respiratoria) y flujo de electrones, en un compuesto colorido (formazán). La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células metabólicamente activas y por tanto viables, con capacidad de proliferar o supervivir. Así, se exponen células durante tiempos definidos a suspensiones homogéneas de NMs a concentraciones crecientes conocidas. De manera simplificada, la viabilidad (proliferación o supervivencia) celular se puede expresar de la siguiente manera:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100 \quad (1)$$

donde DO se refiere a la densidad óptica de los cultivos no tratados (control) y de las muestras expuestas al NM. Una disminución en la actividad metabólica, es decir, un menor DO, sugiere que el material es tóxico a las condiciones analizadas. La detección de la producción de formazán puede deberse directamente al proceso mitocondrial intracelular o, a una adaptación para su cuantificación extracelular. Ésta última, requiere del uso de un acoplador trans-membranar de electrones, por ejemplo el fenasin metosulfato (PMS). La **Figura 5**, ilustra el fundamento básico de los métodos de evaluación toxicológica

*in vitro* basados en la reducción de sales de tetrazolio por actividad mitocondrial.



**Figura 5:** Fundamento de los ensayos estándar de evaluación toxicológica *in vitro* basados en la reducción de sales de tetrazolio.

Además de poder evaluar la actividad metabólica a nivel celular, para así determinar la viabilidad y efecto del tratamiento con NMs, existen otros métodos que se adaptan sencillamente para estudiar, por ejemplo; el daño causado a la membrana celular, cuantificar células vivas y muertas, cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (altamente tóxicas), entre otras. Partiendo de la búsqueda sistemática aquí reportada, la **Tabla 2** separa y enlista una serie de ensayos *in vitro* para elaborar estudios complementarios de la toxicidad inducida por NMs.

Tabla 2: Ensayos comunes para evaluar la toxicidad de NMs en modelos celulares.

Ensayo	Substancia	Método de detección
<b>Actividad metabólica</b>		
MTT	bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	Colorimetría, $\lambda_{\text{Abs}}=550-600 \text{ nm}$
MTS	3-(4,5,dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio	Colorimetría, $\lambda_{\text{Abs}}= 490 \text{ nm}$
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido	Colorimetría, $\lambda_{\text{Abs}}= 450 \text{ nm}$
WST-1	4-(3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio)-1,3-disulfonato de benceno	Colorimetría, $\lambda_{\text{Abs}}= 440 \text{ nm}$
CCK-8	2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio	Colorimetría, $\lambda_{\text{Abs}}= 450 \text{ nm}$

alamarBlue	Resazurina, 7-hidroxi-3 H-fenoxazin-3- ona 10-óxido	Colorimetría y fluorimetría, $\lambda_{Abs} = 570 \text{ nm}$ $\lambda_{Exc} = 530 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 590 \text{ nm}$
<b>Daño a la membrana</b>		
LDH	Cloruro de 2-(4-yodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5- feniltetrazolio	Colorimetría, $\lambda_{Abs} = 490 \text{ nm}$
<b>Vida/muerte</b>		
DET	Azul de tripano	Tinción, contaje por microscopía óptica
Calceína AM	Calceína AM/EthD-1	Fluorimetría, observación confocal $\lambda_{Exc-CAM} = 488 \text{ nm}$ $\lambda_{Exc-Eth} = 543 \text{ nm}$
<b>Contenido de proteína celular</b>		
SRB	Sulforodamina B	Colorimetría y fluorimetría, $\lambda_{Abs} = 564 \text{ nm}$ $\lambda_{Exc} = 488 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$
<b>Especies reactivas de oxígeno</b>		
ROS	DCFH/DA, 2,7-dicloro- dihidrofluoresceína	Fluorimetría, $\lambda_{Exc} = 485 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 527 \text{ nm}$

## 5. La Hap pura y funcional como vehículo para liberación de fármacos

Los NMs para la liberación selectiva y controlada de fármacos antineoplásicos, surgieron como una de las primeras grandes ramas de la Nanomedicina (Couvreur et al. 1982). Estos, tienen como objetivo minimizar las reacciones adversas a la quimioterapia convencional potencializando la acumulación y entrega eficaz de los fármacos en el sitio enfermo. Asimismo, pueden ser diseñados para la entrega de silenciadores genéticos, inmunoreguladores u hormonas, buscando fortalecer la aplicación clínica de nuevas terapias (Ignjatović et al. 2018; Zhao et al. 2017; Cheang et al. 2018). Así pues, la Hap es una plataforma biomimética con gran potencial para albergar biomoléculas de interés terapéutico.

Recientemente, El-Bassyouni G.T., et al (2020) desarrolló nano-Hap usando conchas de mejillón, fuente natural de  $\text{CaCO}_3$  (>98.6%), por el método de precipitación química. En este estudio, se evaluó la toxicidad *in vitro*, tanto de los polvos de la fuente (concha) como de la Hap sintetizada, para enaltecer su cualidad bio-compatibles y regenerativa para uso biomédico. Brevemente, las conchas se limpiaron, deshidrataron y molieron, para posteriormente procesar el carbonato de calcio con ácido

nítrico y obtener  $\text{Ca(NO}_3)_2$ . Se añadió gradualmente una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y se ajustó el pH a 9. El precipitado se secó a  $70^\circ\text{C}$  y calcinó a  $900^\circ\text{C}$ . El análisis termogravimétrico (de temperatura ambiente a  $1000^\circ\text{C}$ ) de la Hap, indicó una pérdida másica de ca. 44%, resultado de su deshidratación ( $\sim 178^\circ\text{C}$ ), descarbonización ( $-\text{CO}_2$ ,  $700\text{-}900^\circ\text{C}$ ) y desnitrificación y deshidroxilación ( $-\text{NH}_4\text{NO}_3$  hasta  $845^\circ\text{C}$ ). Por DRX, los autores mostraron la alta pureza y cristalinidad de los polvos calcinados de Hap sintetizada a partir de conchas de mejillón. En las micrografías electrónicas se observaron agregados de entre 80 y 200 nm, los cuales contienen Hap en forma de grano ultra-fino menor a 40 nm. La caracterización fisicoquímica de esta nano-Hap se complementó con análisis elemental por espectroscopia de dispersión de energía por rayos X (EDX, por sus siglas en inglés) y funcional por IR-TF. La toxicidad de los polvos, tanto de la fuente como de la nano-Hap, se evaluó por el método SRB en tres líneas celulares humanas cancerosas; MCF-7 (mama), HepG2 (hígado) y Caco-2 (colon), en células madre mesenquimales humanas (hMSC) y células epiteliales. Los polvos no indujeron toxicidad en el rango de concentración evaluado (0.01 a  $1000 \mu\text{g/mL}$ ). Adicionalmente, se observó que las células mesenquimales y epiteliales, en presencia de estos materiales, no pierden su capacidad de proliferar (7 días), sugiriendo una fuerte asociación entre la Hap y las células.

Del estudio de sistemas puros de nano-Hap, pasamos a plataformas multi-funcionales con capacidad de retención y liberación controlada de fármacos. La reciente publicación de Ram Prasad S., et al (2020), reportó la ingeniería de un NM tipo núcleo-coraza. Esta estructura es análoga a un huevo, es decir, contiene un centro (yema) con cierta composición química, propiedades y función; y una o varias capas externas (clara y cascarrón) que poseen cualidades diferentes.

Ram Prasad S., et al (2020) sintetizaron, por la técnica de electrospray, NMs multi-capa que contienen un núcleo de Hap y doxorubicina (DOX), una capa de quitosano y, otra última de policaprolactona (PCL) y metotrexato (MTX). La DOX y el MTX son fármacos quimioterapéuticos ampliamente prescritos para el combate de diversos tipos de cáncer. Inicialmente, la Hap se preparó por precipitación química usando  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Ca(NO}_3)_2$  a un pH de entre 10.5 y 11. Los polvos se lavaron, secaron y calcinaron a  $800^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la DOX se encapsuló por adsorción simple a  $4^\circ\text{C}$ . La cantidad de DOX encapsulada (68%) se calculó por espectroscopia UV-Vis ( $Abs = 480 \text{ nm}$ ) a partir de los lavados y, el compuesto Hap-DOX se liofilizó para su uso posterior. La emulsión de electrospray se preparó agregando una solución de quitosano y Hap-DOX a una mezcla de PCL-MTX en presencia de Tween 20, usado éste como surfactante. La emulsión óptima se procesó en un sistema ESPIN Nano aplicando un voltaje de entre 10 y 25 kV con una separación de 10 cm entre la aguja y el colector. La muestra optimizada (0.5 mL/h, 16-13 kV) se caracterizó por IR-TF y DRX para conocer su química funcional y cristalinidad. La nano-Hap funcional obtenida, tiene una morfología esférica, diámetro promedio de 112 nm y carga superficial de +25 mV. Su estructura de núcleo/coraza se confirmó por TEM. Estos resultados representan un avance significativo en el uso de la técnica de electrospray para la obtención de nano-Hap como vehículo para la co-liberación de dos fármacos convencionales, uno hidrofílico (DOX) y otro hidrofóbico (MTX). La capacidad de carga se estimó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) y detectores UV de 254 nm (DOX) y 302 nm (MTX). El sistema núcleo/coraza tiene una

eficiencia de encapsulamiento de aproximadamente 85% para MTX y 38% para DOX. Se evaluó la cinética de co-liberación de los fármacos en soluciones tampón de fosfato salino (PBS) a pH de 7 y 5, simulando los posibles escenarios tumorales, a 37°C hasta por 192 horas. Se observó a ambos pHs, una liberación rápida de MTX al inicio de la cinética (1h) y una liberación posterior sostenida. Contrario, la DOX se liberó de manera sostenida desde el inicio. A pH de 7, se liberó un máximo de 28 y 13% respectivamente para MTX y DOX después de 8 días. A pH de 5, se liberó un máximo, después de 8 días, de 40 y 20% respectivamente para MTX y DOX. Los autores usaron dos protocolos para determinar la toxicidad de la co-liberación de DOX y MTX. Se realizaron ensayos MTT en células humanas de osteosarcoma (OMG-63). Para el primer protocolo de determinación directa, suspensiones frescas de 7.8 a 1000 µg/mL del MN se incubó durante 24 y 72 horas en cultivos de OMG-63. Los fármacos libres se utilizaron como controles positivos de toxicidad y la DO se leyó a 570 nm. Para el segundo protocolo de determinación indirecta, los NMs se suspendieron en medio de cultivo y se mantuvieron por 7 días a 37°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se expusieron las células durante 24 y 72 horas para realizar el ensayo de toxicidad. El estudio toxicológico *in vitro* determinó que la muerte celular está directamente relacionada con la liberación de los fármacos, siendo más pronunciado el efecto tóxico a mayor concentración del vehículo y tiempo de incubación. Notablemente, Ram Prasad S., et al (2020) optimizaron un método innovador para obtener NMs híbridos de Hap, co-liberar dos fármacos antineoplásicos que tienen un efecto sinérgico para causar la muerte de células de tumores sólidos en los huesos. Estos pueden llegar a considerarse resultados *in vitro* alentadores para proseguir con evaluaciones a mayor escala y, proponer alternativas clínicas en el tratamiento de una neoplasia maligna que busca innovación terapéutica.

Por otro lado, Lelli M. et al (2016) propone un modelo basado en el uso de láminas de Hap (morfología que mimetiza el hueso) para liberar dos compuestos de platino (1 y 2) derivados de los fármacos convencionales conocidos como carboplatino y cisplatino (cisPt). La Hap se sintetizó a temperatura ambiente usando soluciones acuosas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Las suspensiones obtenidas post-24h de maduración, fueron utilizadas directamente para ser cargadas con los pro-fármacos, a través de un método simple de adsorción. La caracterización fisicoquímica se realizó utilizando algunas de las técnicas básicas descritas con anterioridad. La cantidad de Pt cargado, así como la liberación de los compuestos, se determinó por espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES) digiriendo las muestras en ácido nítrico. La liberación se evaluó a pH 5, 5.5 y 7.4, donde las condiciones ácidas simulan el ambiente tumoral. Los autores investigaron el efecto tóxico de la Hap pura y cargada en células humanas de cáncer de colon (LoVo), pulmón (A549) y hueso (U2OS y U2OS/Pt resistente a CisPt), a través de ensayos MTT. Brevemente, se concluyó que los compuestos de Pt interactúan con la Hap biomimética por adsorción química. La estabilidad de esta plataforma depende del pH del medio, promoviendo la liberación de los pro-fármacos a pH ácido. El compuesto 1 (kiteplanito), a pesar de ser adsorbido en menor proporción, se libera particularmente de manera súbita a pH 5 y, controlada en función del tiempo. Para los ensayos MTT de toxicidad, los autores adaptaron la metodología y emplearon las soluciones de liberación para exponer los diferentes modelos celulares a los pro-fármacos libres. La viabilidad celular disminuye en función de la cinética de liberación de los sistemas estudiados y en congruencia, el kiteplatino resultó ser más eficiente en la

inducción de muerte celular. Notablemente, este estudio *in vitro* muestra el potencial terapéutico de la liberación de kiteplatino a través de nano-Hap para tratar neoplasias malignas de hueso resistentes a la quimioterapia convencional.

A pesar de que los autores precedentes muestran trabajos prometedores diseñando vehículos pasivos, es decir, que a través del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) podrán acumularse en el tejido tumoral (Clemons et al. 2018), en los últimos años han surgido investigaciones para activar la entrega de los fármacos y hacerla así, selectiva al sitio enfermo (Xiong et al. 2016, 2018; Izadi, Meshkini, and Entezari 2019; Verma et al. 2020).

Xiong H., et al (2018) propone el diseño de Hap bio-conjugada para mejorar el desempeño de nuevas terapias moleculares que buscan; tanto bloquear la señalización hacia la formación de tumores metastásicos, causando daño al ADN mitocondrial (promotor de la metástasis), como dirigir al mismo tiempo una terapia efectiva para las micro-metástasis no vascularizadas. De manera simplificada, se preparó Hap por precipitación y se funcionalizó post-síntesis con grupos  $-\text{NH}_2$  usando 3-aminopropil-trietoxisilano. Posteriormente, se modificó la superficie con una combinación de péptidos (moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos a través de enlaces peptídicos, *ie.* entre  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{COOH}$ ) por bloques. La modificación superficial con péptidos, proteínas, anticuerpos, vitaminas y aptámeros; entre otras bio-moléculas, comúnmente se denomina bio-conjugación. La combinación de péptidos empleada en el trabajo de Xiong H., et al (2018), consiste de un módulo CREKA (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala) y otro KLA ( $[\text{D}[\text{Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys}]_2$ ) como estrategia dual de transporte activo para atacar tumores primarios y metástasis. Se encapsuló DOX en la Hap bio-conjugada, para inducir daño al ADN mitocondrial. El material se caracterizó por varias técnicas complementarias como IR-TF, TGA, TEM y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). La toxicidad *in vitro* se evaluó por MTT en células de mama tumorales de mamífero (4T1) y varios ensayos celulares y moleculares se llevaron a cabo para elucidar la respuesta activa del vehículo. Por MTT se observó que el complejo activo es más eficiente que la DOX libre, presenta un efecto sinérgico (índice de combinación  $<0.5$  e índice de reducción de dosis-DOX  $>2.8$ ) y, causa tanto daño mitocondrial como nuclear. El estudio de la eficiencia terapéutica realizado en ratones albinos BALB/c (hembras de 6–8 semanas), arrojó resultados antitumorales prometedores para las neoplasias primarias y micro-metástasis, con una reducida toxicidad colateral. Es así como, vehículos activos pueden ser diseñados y evaluados para mejorar terapias existentes o, proponer nuevos protocolos sinérgicos.

Finalmente, como se mencionó al inicio de esta sección, los vehículos biomiméticos basados en nano-Hap pura o funcional, también pueden ser empleados para liberar genes (Cheang et al. 2018) u hormonas (Ignjatović et al. 2018) que inhiban el crecimiento tumoral. Estas alternativas se han estudiado principalmente en modelos de cáncer de mama.

Brevemente, en Ignjatovic N.L., et al (2018) se reporta la síntesis de una nano-Hap esférica de 65 nm, funcionalizada *ex situ* con lactato de oligosacárido de quitosano (ChOLS) y dos derivados sintéticos del androstano (esteroide de 19 carbonos que es la estructura básica de las hormonas sexuales masculinas). Los sistemas se caracterizaron por RMN, IR-TF, calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), TGA con

análisis térmico diferencial y espectroscopia de masas, HPLC, DLS, potencial zeta y microscopia de fuerza atómica; mostrando diferentes propiedades fisicoquímicas debido al acoplamiento de los esteroides. La liberación de estos se evaluó en soluciones de PBS a 37°C por HPLC. Ambos derivados se liberan siguiendo durante los primeros dos días, una cinética de orden-cero con un 40% en promedio liberado a las 24h. Su liberación es casi completa (>90%) a partir del tercer día de incubación estática a 37°C en PBS. La toxicidad *in vitro* de los sistemas de liberación hormonal se determinó por DET y MTT. Los ensayos se realizaron en dos líneas celulares humanas de cáncer de mama; MCF-7 (expresa receptores para hormonas sexuales masculinas, ER+) y MDA-MB-231 (ER-), células humanas de cáncer de pulmón (A549) y en fibroblastos (células sanas, MRC-5). Se emplearon otros ensayos celulares, como microscopia confocal de fluorescencia y citometría de flujo, para elucidar la internalización y liberación de los sistemas. Los vehículos de nano-Hap funcional libres de hormonas, no causaron toxicidad significativa (<5%) a ningún modelo celular después de 48 horas de incubación. Por el contrario, la Hap cargada resultó tóxica para las células cancerosas en comparación con su efecto en fibroblastos, aumentando así la selectividad de los derivados. De forma notable, uno de los derivados mostró un efecto citotóxico prolongado particularmente para las células MCF-7. Finalmente, se sugiere que la Hap libera los derivados de forma extracelular, sin interferir en su paso a través de la membrana celular. La **Tabla 3**, reúne la información recabada a partir de la búsqueda sistemática realizada (2016-2020), haciendo énfasis principalmente en la molécula de carga (fármaco), modelos celulares y, si se reporta o no experimentación *in vivo*.

Tabla 3: Estudio de la nano-Hap pura o funcional usada como vehículo de liberación controlada de fármacos.

Cargo	Modelo <i>in vitro</i>	Exp. <i>in vivo</i>	Ref.
Kiteplatino	LoVo A549 U2OS U2OS/Pt	No	(Lelli et al. 2016)
Kiteplatino	PC3 hBMSc MDA-MB-231eGFP	No	(Barbanente et al. 2020)
DOX	HepG2	Si	(Xiong et al. 2016)
DOX	4T1	Si	(Xiong et al. 2018)
DOX	Saos-2 HEK-293	No	(Izadi, Meshkini, and Entezari 2019)
DOX	HepG2 WEHI-164 KB WRL-68 WI-26 VA4	No	(Verma et al. 2020)
DOX	L-02	Si	(Wu et al. 2020)
DOX MTX	OMG-63	No	(Prasad, Jayakrishnan, and Kumar 2020)
CD/p53	MCF-7	No	(Zhao et al. 2017)
Esteroides	MCF-7	No	(Ignjatović et al. 2018)

## 6. La Hap funcional y dopada como agente pro-terapéutico

La versatilidad de los métodos de síntesis para la obtención de nano-Hap, ha permitido el desarrollo de innovadoras plataformas híbridas a partir de su dopaje con diferentes iones o, su combinación con otros NMs. Por ejemplo, en Wang Y., et al (2016) encontramos un estudio multi-escalar de nano-Hap dopada con selenio (Se-Hap) en la perspectiva de inhibir el crecimiento tumoral post-extirpación quirúrgica de un osteosarcoma. La Se-Hap se preparó por un método de precipitación química modificando introduciendo  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  *in situ* durante la reacción de precipitación a un pH de 10, 75°C y, utilizando poliacrilato de sodio como agente dispersante. El NM se caracterizó por DRX, DLS, potencial zeta, TEM y ICP-MS. Se obtuvo Se-Hap acicular de aproximadamente 100 nm y con remarcable estabilidad coloidal. Se observó que la incorporación de los iones de Se no modifican las principales características de la Hap pura, distribuyéndose homogéneamente en el cristal. Se determinó la cinética de liberación de Se a 37°C en soluciones tamponadas de PBS a pH de 5 y 7.4 por ICP-MS. Se detectaron dos etapas; observando primeramente una liberación abrupta (0-24 horas), seguida de una etapa sostenida (24-120 h). La liberación se caracterizó por ser pH responsiva, con un efecto mayor a pH de 5, sugiriendo que la liberación es mediada por un mecanismo de degradación de la Hap. La internalización, localización y toxicidad de la Se-Hap se evaluaron en un modelo celular humano de osteosarcoma (MNNG/HOS). Para la internalización y localización se emplearon TEM, microscopia confocal de fluorescencia y citometría de flujo marcando las nano-Hap con fluoresceína. Los resultados indicaron que la Se-Hap es internalizada vía endocitosis no específica y, que en función del tiempo co-localiza con lisosomas (constituyentes ácidos de la célula), degradándose e induciendo así, muerte celular. La viabilidad celular se determinó a través de ensayos CCK-8 y la producción de ROS por ensayos DCFH/DA. Mientras la Hap pura no es tóxica, la viabilidad celular disminuye al aumentar el grado de dopaje. Asimismo, se determinó que la muerte celular es inducida principalmente por la generación intracelular de ROS, la cual se potencializa en presencia de Se. Entre otros ensayos utilizados, el efecto pro-apoptótico del sistema Se-Hap se estudió por Western Blot, técnica que permite detectar y cuantificar proteínas provenientes de tejidos o células en cultivo, a través de su migración en geles de electroforesis y reconocimiento con anticuerpos específicos, y por la técnica TUNEL *in vivo*. Así pues, se investigó el efecto antitumoral en ratones BALB/c (4-6 semanas) que desarrollaron durante 10 días tumores de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> y, se realizó la bioquímica sanguínea. Se utilizó el material con mayor contenido de Se como pro-terapéutico, y controles que consistían en mezclas de Hap y  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . El volumen del tumor se redujo en aproximadamente un 70% con el tratamiento experimental de Se-Hap, sin diferencia significativa con su mezcla equivalente, indicando que la reducción del tumor depende de la cantidad de Se disponible y acumulada en el tejido canceroso. Notablemente, Se-Hap (10% Se) presentó la más baja toxicidad sistémica, sugiriendo que la entrega local y controlada de Se, a través de la biodegradación de la Hap, aumentan la selectividad y eficiencia del tratamiento.

Por otro lado, también se ha diseñado nano-Hap combinada con nanopartículas super-paramagnéticas de óxido de hierro (SPION) o gadolinio, con el propósito de desarrollar plataformas activas multi-funcionales con efecto sinérgico para quimioterapia e imagen médica (Liu et al. 2019; Izadi, Meshkini, and Entezari

2019; Pernal, Wu, and Uskoković 2017). Brevemente, Izadi A., et al (2019) reporta la arquitectura de una Hap modificada con SPION, como alternativa magneto-responsiva para la liberación dirigida de DOX. El híbrido se sintetizó por el método hidrotermal usando diferentes relaciones Hap/SPION, y fue ampliamente caracterizado. El Hap/SPION de mejores cualidades, se cargó con DOX, funcionalizó con poli(etilenglicol) y conjugó con ácido fólico para generar un vehículo estable y de entrega activa. La liberación de DOX se favoreció a través del estímulo de un campo magnético (SMF). La toxicidad se evaluó en células humanas de osteosarcoma (Saos-2) y en células sanas (HEK-293) por ensayos MTT. El vehículo libre de DOX no afectó la actividad metabólica de las células, con o sin la magnetización de éste. Contrariamente, el

compuesto cargado con el fármaco, disminuyó la viabilidad celular, siendo más notable adicionando SMF. Asimismo, la internalización aumento por efecto del SMF. Finalmente, Liu Y., et al (2019) presenta la síntesis de Hap dopada con Gd como agente multi-funcional, es decir, tanto de contraste para imagen médica por resonancia magnética como de transporte y entrega de DOX. Este compuesto mostró un mejor contraste *in vivo*, comparado con moléculas comerciales usadas en diagnóstico clínico, y una reducción importante del tumor (células MCF-7). La **Tabla 4**, reúne otros trabajos especializados en las propiedades fisicoquímicas y pro-terapéuticas de nano-Hap dopada o combinada, como alternativa en el tratamiento de diferentes neoplasias malignas.

Tabla 4: Estudio de la nano-Hap dopada o combinada usada como alternativa en el combate de diversas neoplasias malignas.

Hibridación o dopante	Funcionalización o cargo	Modelo <i>in vitro</i>	Exp. <i>in vivo</i>	Ref.
Se	PAAS	MNNG/HOS	Si	(Yifan Wang et al. 2016)
Se	-	HCCLM9	Si	(Yanhua et al. 2016)
Se	PPAS-catequinas	MNNG/HOS hBMSCs	No	(Khan et al. 2019)
Se	-	SOSP-9607	Si	(Yanhua Wang et al. 2019)
Se	Kiteplatino	MDA-MB-231eGFP PC3 hBMSc	No	(Barbanente et al. 2020)
Sr	DOX	MCF-7 Zr-75	No	(Agrawal et al. 2018)
Ag, Fe, Ag/Fe	5-fluorouracilo	HEK-293 HeLa	No	(Veerla et al. 2019)
Fe	-	MDA-MB-468	No	(Ribeiro, Monteiro, and Laranjeira 2020)
Fe-SiO <sub>2</sub>	SLN (antiinflamatorio)	HEK-293 C57BL/6J	No	(Orooji et al. 2020)
SPION	-	K7M2-pCl Neo U87-MG E297 hMSCs	No	(Pernal, Wu, and Uskoković 2017)
SPION	PEG/AF/DOX	Saos-2 HEK-293	No	(Izadi, Meshkini, and Entezari 2019)
Gd	PEI/DOX	MCF-7	Si	(Liu et al. 2019)
GO	Plásmido p-HRE/ERE-Sur-TK	MCF-7 MCF 10A MDA-MB-231	No	(Cheang et al. 2018)

## 7. Conclusiones

De manera general, esta revisión engloba los avances y expectativas de los últimos años para el uso potencial de la hidroxiapatita nanoestructurada como agente adyuvante para mejorar el tratamiento de varios tipos de cáncer, principalmente el de hueso y mama. Sus propiedades la hacen altamente atrayente para proponer nuevos protocolos que combinen las terapias convencionales con la nanotecnología aplicada. Hemos proporcionado información básica sobre los métodos de síntesis, caracterización y evaluación toxicológica *in vitro*, con la finalidad de ilustrar, a la comunidad de estudiantes e investigadores del área de materiales avanzados, las primeras etapas del desarrollo de un nano-fármaco. Notablemente, la

investigación científica y tecnológica, con orientación multi- e inter disciplinar, en el área de la nanomedicina para cáncer aumenta año con año. Para el caso de la nano-Hap, observamos que en los últimos 5 años, se ha avanzado en la funcionalización, bio-conjugación, carga (fármaco) y dopaje de la estructura, para obtener vehículos eficientes y selectivos a las células cancerosas. Sin embargo, el número de publicaciones con ensayos pre-clínicos (*in vivo*), tan sólo representó el 30% de los resultados obtenidos a partir de la estrategia sistemática utilizada, lo que aún sugiere una disyunción entre la investigación básica y aplicada.

Finalmente, es importante mencionar que la aceptación clínica de la nano-Hap sintética como sustituto óseo, muestra un

camino prometedor para su implementación como adyuvante en tratamiento de cáncer al combinar las propiedades intrínsecas del material biomimético, con aquellas que puede adquirir a través de su hibridación. A la fecha, siete NMs inorgánicos a base de Hap (Vitoss<sup>®</sup>, Ostim<sup>®</sup>, OsSatura<sup>®</sup>, NanOss<sup>®</sup>, EquivaBone<sup>®</sup>, Nano Streams y Nano Bone) han sido aprobados por la agencia reguladora Food and Drug Administration (U.S. FDA) y se encuentran en ensayos clínicos (fases II, III y IV) para el tratamiento de enfermedades en los huesos (Huang et al. 2020), antecedentes de gran relevancia para su uso potencial en el tratamiento de osteosarcomas y otras neoplasias malignas.

## 8. Referencias

- Agrawal, Shital, Madhura Kelkar, Abhijit De, Ajit R. Kulkarni, and Mayuri N. Gandhi. 2018. "Newly Emerging Mesoporous Strontium Hydroxyapatite Nanorods: Microwave Synthesis and Relevance as Doxorubicin Nanocarrier." *Journal of Nanoparticle Research* 20 (9): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4335-y>.
- Barbanente, Alessandra, Robin A. Nadar, Lorenzo Degli Esposti, Barbara Palazzo, Michele Iafisco, Jeroen J.J.P. Van Den Beucken, Sander C.G. Leeuwenburgh, and Nicola Margiotta. 2020. "Platinum-Loaded, Selenium-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles Selectively Reduce Proliferation of Prostate and Breast Cancer Cells Co-Cultured in the Presence of Stem Cells." *Journal of Materials Chemistry B* 8 (14): 2792–2804. <https://doi.org/10.1039/d0tb00390e>.
- Cheang, Tuck Yun, Yi Yan Lei, Zhan Qiang Zhang, Hong Yan Zhou, Run Yi Ye, Ying Lin, and Shenming Wang. 2018. "Graphene Oxide–Hydroxyapatite Nanocomposites Effectively Deliver HSV-TK Suicide Gene to Inhibit Human Breast Cancer Growth." *Journal of Biomaterials Applications* 33 (2): 216–26. <https://doi.org/10.1177/0885328218788242>.
- Clemons, Tristan D., Ruhani Singh, Anabel Sorolla, Nutan Chaudhari, Alysia Hubbard, and K. Swaminatha Iyer. 2018. "Distinction between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy." *Langmuir* 34 (50): 15343–49. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02946>.
- Couvreur, P., B. Kante, L. Grislain, M. Roland, and P. Speiser. 1982. "Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles II: Doxorubicin-Loaded Nanoparticles." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (7): 790–92. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710717>.
- Cui, Xinhui, Tong Liang, Changsheng Liu, Yuan Yuan, and Jiangchao Qian. 2016. "Correlation of Particle Properties with Cytotoxicity and Cellular Uptake of Hydroxyapatite Nanoparticles in Human Gastric Cancer Cells." *Materials Science and Engineering: C* 67 (October): 453–60. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.034>.
- El-Bassouini, Gehan T., Samah S. Eldera, Sayed H. Kenawy, and Esmat M.A. Hamzawy. 2020. "Hydroxyapatite Nanoparticles Derived from Mussel Shells for in Vitro Cytotoxicity Test and Cell Viability." *Heliyon* 6 (6): e04085. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04085>.
- Ficai, Anton, Catarina MARQUES, José M.F. FERREIRA, Ecaterina Andronesu, Denisa FICAI, and Maria Sonmez. 2014. "Multifunctional Materials for Bone Cancer Treatment." *International Journal of Nanomedicine* 9 (May): 2713. <https://doi.org/10.2147/ijn.s55943>.
- Huang, Hui, Wei Feng, Yu Chen, and Jianlin Shi. 2020. "Inorganic Nanoparticles in Clinical Trials and Translations." *Nano Today* 35. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100972>.
- Ignjatović, Nenad L., Marija Sakač, Ivana Kuzminac, Vesna Kojić, Smilja Marković, Dana Vasiljević-Radović, Victoria M. Wu, Vuk Uskoković, and Dragan P. Uskoković. 2018. "Chitosan Oligosaccharide Lactate Coated Hydroxyapatite Nanoparticles as a Vehicle for the Delivery of Steroid Drugs and the Targeting of Breast Cancer Cells." *Journal of Materials Chemistry B* 6 (43): 6957–68. <https://doi.org/10.1039/c8tb01995a>.
- Izadi, Azadeh, Azadeh Meshkini, and Mohammad H. Entezari. 2019. "Mesoporous Superparamagnetic Hydroxyapatite Nanocomposite: A Multifunctional Platform for Synergistic Targeted Chemotherapy." *Materials Science and Engineering: C* 101 (August): 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.066>.
- Khan, Suliman, Muhammad Wajid Ullah, Rabeea Siddique, Yang Liu, Ismat Ullah, Mengzhou Xue, Guang Yang, and Hongwei Hou. 2019. "Catechins-Modified Selenium-Doped Hydroxyapatite Nanomaterials for Improved Osteosarcoma Therapy Through Generation of Reactive Oxygen Species." *Frontiers in Oncology* 9 (JUN): 499. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00499>.
- Lelli, Marco, Norberto Roveri, Cristina Marzano, James D Hoeschele, Alessandra Curci, Nicola Margiotta, Valentina Gandin, and Giovanni Natile. 2016. "Hydroxyapatite Nanocrystals as a Smart, PH Sensitive, Delivery System for Kiteplatin" 45: 13187. <https://doi.org/10.1039/c6dt01976e>.
- Li, Li, Haihua Pan, Jinhui Tao, Xurong Xu, Caiyun Mao, Xinhua Gu, and Ruikang Tang. 2008. "Repair of Enamel by Using Hydroxyapatite Nanoparticles as the Building Blocks." *Journal of Materials Chemistry* 18 (34): 4079–84. <https://doi.org/10.1039/b806090h>.
- Liu, Ying, Yuxia Tang, Ying Tian, Jiang Wu, Jing Sun, Zhaogang Teng, Shouju Wang, and Guangming Lu. 2019. "Gadolinium-Doped Hydroxyapatite Nanorods as T1 Contrast Agents and Drug Carriers for Breast Cancer Therapy." *ACS Applied Nano Materials* 2 (3): 1194–1201. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b02036>.
- Maia, Ana Luiza Chaves, Carolina de Aguiar Ferreira, André Luis Branco de Barros, Aline Teixeira Maciel e Silva, Gilson Andrade Ramaldes, Armando da Silva Cunha Júnior, Diogo Coelho de Pádua Oliveira, Christian Fernandes, and Daniel Crístian Ferreira Soares. 2018. "Vincristine-Loaded Hydroxyapatite Nanoparticles as a Potential Delivery System for Bone Cancer Therapy." *Journal of Drug Targeting* 26 (7): 592–603. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1401078>.
- Mendoza-Anaya, D., E. Flores-Díaz, G. Mondragón-Galicia, M. E. Fernández-García, E. Salinas-Rodríguez, T. V.K. Karthik, and V. Rodríguez-Lugo. 2018. "The Role of Eu on the Thermoluminescence Induced by Gamma Radiation in Nano Hydroxyapatite." *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 29 (18): 15579–86. <https://doi.org/10.1007/s10854-018-9147-4>.
- Olszta, Matthew J., Xingguo Cheng, Sang Soo Jee, Rajendra Kumar, Yi Yeoun Kim, Michael J. Kaufman, Elliot P. Douglas, and Laurie B. Gower. 2007. "Bone Structure and Formation: A New Perspective." *Materials Science and Engineering R: Reports*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- Orooji, Yasin, Sobhan Mortazavi-Derazkola, Seyede Masoumeh Ghoreishi, Mahnaz Amiri, and Masoud Salavati-Niasari. 2020. "Mesoporous Fe3O4@SiO2-Hydroxyapatite Nanocomposite: Green Sonochemical Synthesis Using Strawberry Fruit Extract as a Capping Agent, Characterization and Their Application in Sulfasalazine Delivery and Cytotoxicity." *Journal of Hazardous Materials* 400 (December): 123140. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123140>.
- Ortiz, S. Lopez, J. Hernandez Avila, M. P. Gutierrez, Heberte Gomez-Pozos, T. V.K. Karthik, and V. Rodriguez Lugo. 2017. "Hydrothermal Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Microstructures." *2017 14th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control, CCE 2017*, 0–3. <https://doi.org/10.1109/ICEEE.2017.8108902>.
- Pernal, Sebastian, Victoria M. Wu, and Vuk Uskoković. 2017. "Hydroxyapatite as a Vehicle for the Selective Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles against Human Glioblastoma Cells." *ACS Applied Materials and Interfaces* 9 (45): 39283–302. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15116>.
- Prasad, S. Ram, A. Jayakrishnan, and T. S.Sampath Kumar. 2020. "Combinational Delivery of Anticancer Drugs for Osteosarcoma Treatment Using Electrosprayed Core Shell Nanocarriers." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 31 (5): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06379-5>.
- Ribeiro, Tiago P., Fernando J. Monteiro, and Marta S. Laranjeira. 2020. "Duality of Iron (III) Doped Nano Hydroxyapatite in Triple Negative Breast Cancer Monitoring and as a Drug-Free Therapeutic Agent." *Ceramics International* 46 (10): 16590–97. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.231>.
- Rodríguez-Lugo, V., T. V.K. Karthik, D. Mendoza-Anaya, E. Rubio-Rosas, L. S. Villaseñor Cerón, M. I. Reyes-Valderrama, and E. Salinas-Rodríguez. 2018. "Wet Chemical Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite Flakes: Effect of PH and Sintering Temperature on Structural and Morphological Properties." *Royal Society Open Science* 5 (8). <https://doi.org/10.1098/rsos.180962>.
- Rodríguez Lugo, V., V. M. Castaño, and E. Rubio-Rosas. 2016. "Biomimetic Growth of Hydroxyapatite on SiO2-PMMA Hybrid Coatings." *Materials Letters* 184: 265–68. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.08.068>.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi, and Ahmad Jamshidi. 2013. "Synthesis Methods for Nanosized Hydroxyapatite with Diverse Structures." *Acta Biomaterialia* 9 (8): 7591–7621.

- <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- Sánchez-Campos, D., D. Mendoza-Anaya, M. I. Reyes-Valderrama, S. Esteban-Gómez, and V. Rodríguez-Lugo. 2020. "Cationic Surfactant at High PH in Microwave HAp Synthesis." *Materials Letters* 265 (April): 127416. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.127416>.
- Selvaraju, Sharmila, Sathya Ramalingam, and Jonnalagadda Raghava Rao. 2018. "Inorganic Apatite Nanomaterial: Modified Surface Phenomena and Its Role in Developing Collagen Based Polymeric Bio-Composite (Coll-PLGA/HAp) for Biological Applications." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (December): 734–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.038>.
- Singh, Gurdyal, Ravinder Pal Singh, and Sukhwinder Singh Jolly. 2020. "Customized Hydroxyapatites for Bone-Tissue Engineering and Drug Delivery Applications: A Review." *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05222-1>.
- Szceś, Aleksandra, Lucyna Hołysz, and Emil Chibowski. 2017. "Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications." *Advances in Colloid and Interface Science* 249 (April): 321–30. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>.
- Veerla, Sarath Chandra, Da Reum Kim, Jongjun Kim, Honglae Sohn, and Sung Yun Yang. 2019. "Controlled Nanoparticle Synthesis of Ag/Fe Co-Doped Hydroxyapatite System for Cancer Cell Treatment." *Materials Science and Engineering C* 98 (January): 311–23. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.148>.
- Verma, Gunjan, Neena G. Shetake, Shruti Pandrekar, B. N. Pandey, P. A. Hassan, and K. I. Priyadarsini. 2020. "Development of Surface Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles for Enhanced Specificity towards Tumor Cells." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 144 (December 2019): 105206. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105206>.
- Villaseñor-Cerón, Lesly Sabina, Demetrio Mendoza-Anaya, María Isabel Reyes-Valderrama, Eleazar Salinas Rodríguez, and Ventura Rodríguez-Lugo. 2019. "Estudio Termodinámico Para La Obtención de Nanohidroxiapatita Por El Método de Microondas." *Pádi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI* 7 (13): 35–40. <https://doi.org/10.29057/icbi.v7i13.4131>.
- Villaseñor Cerón, L. S., V. Rodríguez Lugo, J. A. Arenas Alatorre, M. E. Fernández-García, M. I. Reyes-Valderrama, P. González-Martínez, and D. Mendoza Anaya. 2019. "Characterization of Hap Nanostructures Doped with AgNp and the Gamma Radiation Effects." *Results in Physics* 15 (September): 102702. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102702>.
- Wang, Yanhua, Na Qin, Caifa Zhao, Jiehua Yuan, Shiqi Lu, Wenjing Li, Huiyao Xiang, and Hang Hao. 2019. "The Correlation between the Methylation of PTEN Gene and the Apoptosis of Osteosarcoma Cells Mediated by SeHA Nanoparticles." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 184 (December): 110499. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110499>.
- Wang, Yifan, Jianglin Wang, Hang Hao, Mingle Cai, Shiyao Wang, Jun Ma, Yan Li, Chuanbin Mao, and Shengmin Zhang. 2016. "In Vitro and in Vivo Mechanism of Bone Tumor Inhibition by Selenium-Doped Bone Mineral Nanoparticles." *ACS Nano* 10 (11): 9927–37. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03835>.
- Weerasuriya, D.R.K., W.P.S.L. Wijesinghe, and R.M.G. Rajapakse. 2017. "Encapsulation of Anticancer Drug Copper Bis(8-Hydroxyquinoline) in Hydroxyapatite for PH-Sensitive Targeted Delivery and Slow Release." *Materials Science and Engineering: C* 71 (February): 206–13. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.010>.
- Wu, Zihan, Xiaoyu Ma, Yifan Ma, Zhaogang Yang, Yuan Yuan, and Changsheng Liu. 2020. "Core/Shell PEGS/HA Hybrid Nanoparticle Via Micelle-Coordinated Mineralization for Tumor-Specific Therapy." *ACS Applied Materials and Interfaces* 12 (10): 12109–19. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c00068>.
- Xiaoyu, Ma, Dong Xiuling, Zang Chunyu, Sun Yi, Qian Jiangchao, Yuan Yuan, and Liu Changsheng. 2019. "Polyglutamic Acid-Coordinated Assembly of Hydroxyapatite Nanoparticles for Synergistic Tumor-Specific Therapy." *Nanoscale* 11 (32): 15312–25. <https://doi.org/10.1039/c9nr03176f>.
- Xiong, Hui, Shi Du, Jiang Ni, Jianping Zhou, and Jing Yao. 2016. "Mitochondria and Nuclei Dual-Targeted Heterogeneous Hydroxyapatite Nanoparticles for Enhancing Therapeutic Efficacy of Doxorubicin." *Biomaterials* 94 (July): 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.004>.
- Xiong, Hui, Shi Du, Ping Zhang, Zhijie Jiang, Jianping Zhou, and Jing Yao. 2018. "Primary Tumor and Pre-Metastatic Niches Co-Targeting 'Peptides-Lego' Hybrid Hydroxyapatite Nanoparticles for Metastatic Breast Cancer Treatment." *Biomaterials Science* 6 (10): 2591–2604. <https://doi.org/10.1039/c8bm00706c>.
- Yanhua, Wang, Hang Hao, Yan Li, and Shengmin Zhang. 2016. *Selenium-Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles and Their in Vivo Antitumor Effect on Hepatocellular Carcinoma*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 140. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.056>.
- Zhao, Lina, Wenhui Zhao, Ye Liu, Xue Chen, and Yan Wang. 2017. "Nano-Hydroxyapatite-Derived Drug and Gene Co-Delivery System for Anti-Angiogenesis Therapy of Breast Cancer." *Medical Science Monitor* 23 (October): 4723–32. <https://doi.org/10.12659/MSM.902538>.

## Apéndice A.

Tabla S1: Resultados de la búsqueda sistemática del 2016 a la fecha sobre el uso de nano-Hap para tratamiento de cáncer.

Sistema	Método de Síntesis	Morfología	Dopante	Funcionalización	Bio-conjugación o marcaje	Fármaco	Modelo celular	Tipo de cáncer	Método de toxicidad <i>in vitro</i>	Modelo <i>in vivo</i>	Ref.
Hap	NM comercial		-	APS (-NH <sub>2</sub> )	-	CD p53	MCF-7	Mama	MTT	-	(Zhao et al. 2017)
Hap/SPION	Modificación de precipitación química. Hibridación ex situ	Esférica y de rodillo	SPION	-	-	-	C57BL/6J K7M2-pCl Neo U87-MG E297 hMSCs	Hueso Cerebro Cerebro	MTT	-	(Pernal, Wu, and Uskoković 2017)
Hap-Se	Modificación con hibridación in situ	Acicular	Se	PAAS	FITC	-	MNNG/HOS	Hueso	CCK-8 DCFH/DA	BALB/c (4-6 semanas)	(Yifan Wang et al. 2016)
Hap	Precipitación a temperatura ambiente	Acicular/laminar	-	-	-	kiteplatino	LoVo A549 U2OS U2OS/Pt	Colon Pulmón Hueso Hueso (resistente a cisPt)	MTT	-	(Lelli et al. 2016)
Hap	NM comercial	Semi-esférica	-	APS	AH	DOX	HepG2	Hígado	MTT	Rata Kunming y conejo de Nueva Zelanda	(Xiong et al. 2016)
Hap-Se	Co-precipitación con hibridación in situ	Acicular	Se	-	-	-	HCCLM9	Hígado	-	BALB/c (3-4 semanas)	(Yanhua et al. 2016)
Hap	Sonoquímica asistida con microondas	Varilla corta	-	AMPTES	FITC	-	MGC80-3 L-02	Estómago	MTT	-	(Cui et al. 2016)
Hap	Combinación de varias rutas	Hexagonal con huecos	-	-	-	Cu-bis(8-HQ)	-	-	-	-	(Weerasuriya, Wijesinghe, and Rajapakse 2017)
Hap	Hidrotermal	Varilla	-	-	-	Vincristina	-	-	-	-	(Maia et al. 2018)
Hap	Combinación de sol-gel con microemulsión	Esférica	-	Ch-OSL	-	Derivados del androstano (esteroide)	MCF-7 MDA-MB-231 A549 MRC-5	Mama Mama Pulmón	DET MTT	-	(Ignjatović et al. 2018)
Hap	Precipitación	Esférica	-	PLGA-Colágeno	-	-	A549 L927	Pulmón	MTT	-	(Selvaraju, Ramalingam, and Rao 2018)
Hap	Precipitación	Anisotrópica	-	APS	Péptido PMC	DOX	4T1	Mama	MTT	BALB/c (6-8 semanas)	(Xiong et al. 2018)
GO/Hap	Combinación	Flor	Grafeno	-	-	Plásmido p-HRE/ERE-Sur-TK	MCF-7 MDA-MB-231	Mama Mama	MTS	-	(Cheang et al. 2018)
Hap-Sr	Hidrotermal por microondas con	Varilla	Sr	CTAB	-	DOX	MCF 10A MCF-7 Zr-75	Mama Mama	MTT	-	(Agrawal et al. 2018)

Hap-Se	hibridación in situ Combinación precipitación con sonoquímica. Hibridación in situ	Varilla	Se	PPAS-catequinas	-	-	MNNG/HOS	Hueso	CCK-8	-	(Khan et al. 2019)
Hap-Ag Hap-Fe Hap-Ag/Fe	Co-precipitación	Esférica y varilla	Ag, Fe, Ag/Fe	-	-	5-fluorouracilo	HEK-293 HeLa	- Cérvix/útero	DCFH/DA MTT	-	(Veerla et al. 2019)
Hap/SPION	Precipitación con hibridación ex situ	Varilla	SPION	PEG	AF	DOX	Saos-2 HEK-293	Hueso -	MTT	-	(Izadi, Meshkini, and Entezari 2019)
Hap-Se	Precipitación con hibridación in situ	Anisotrópica	Se	-	-	-	SOSP-9607	Hueso	MTT	BALB/c (3-4 semanas)	(Yanhua Wang et al. 2019)
Hap-Gd	Hidrotermal con hibridación in situ	Varilla	Gd	PEI	-	DOX	MCF-7	Mama	MTT	BALB/c (5 semanas)	(Liu et al. 2019)
mFSH	Sonoquímica	Esférica	-	Extractos frutales APTES	-	SLN	HEK-293	-	XTT	Ratas (n.e.)	(Orooji et al. 2020)
Hap-Se	Precipitación con hibridación in situ	Anisotrópica	Se	-	-	Kiteplatino - pirofosfato	MDA-MB- 231eGFP PC3 hBMSc	Mama Próstata -	CCK-8	-	(Barbanente et al. 2020)
Hap-Fe	Precipitación	Esférica	Fe	-	-	-	MDA-MB- 468	Mama	Resazurina Calceina AM/Yoduro de propidio	-	(Ribeiro, Monteiro, and Laranjeira 2020)
Hap	Co-precipitación	Esférica	-	Gelatina-EDC	AF	DOX	HepG2 WEHI-164 KB WRL-68 WI-26 VA4	Hígado Piel Boca -	MTT	-	(Verma et al. 2020)
PEGS/HA	Micro-emulsión	Esférica	-	Gelatina-NHS	-	DOX	L-02 MCF-7 MCF-7 HepG-2 Caco-2 h-MSc	Mama Mama Hígado Colon -	MTT	Ratónn nude (18-20g)	(Wu et al. 2020)
Hap	Precipitación	Grano	-	-	-	-	-	-	SRB	-	(El-Bassyouni et al. 2020)
Hap	Precipitación	Esférica	-	PCL CH	-	DOX MTX	OMG-63	Hueso	MTT	-	(Prasad, Jayakrishnan, and Kumar 2020)