



Vectorización de Nanotransportadores Poliméricos de Nanopartículas de Plata para Tratamiento de Cáncer

R. Casañas Pimentel¹, M. Da Silva Pinto², A. Monroy-García³, J. Hinestroza², C. Gómez-García⁴, E. San Martín-Martínez¹

¹Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, México.

²College of Human Ecology, Cornell University, Ithaca, NY, EUA.

³Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

⁴Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, México

Resumen

Se reporta la síntesis de nanopartículas de plata de 5 nm de diámetro y su encapsulación en nanotransportadores biocompatibles con diámetros entre 70 y 200 nm mediante una modificación del sistema emulsión- evaporación del solvente. Se evaluaron diversas dosis de las nanopartículas de plata y de los nanotransportadores en las líneas celulares de cáncer del cérvix uterino: Ca Ski y HeLa, demostrando que en este modelo las nanopartículas de plata presentan toxicidad aún encapsuladas. Se propone el uso de la aglutinina de frijol de soya (SBA) para el direccionamiento del sistema de liberación farmacológica por su ya descrita unión selectiva a carbohidratos específicos de membranas plasmáticas de células neoplásicas y por su acción citotóxica intrínseca, y se inicia con el estudio de su efecto en la expresión genética en la línea celular HeLa mediante microarreglos de cDNA a fin de aportar conocimiento sobre su mecanismo de acción.

Introducción

El cáncer es actualmente la primera causa de muerte a nivel mundial. En el 2008, se presentaron cerca de 7.6 millones de muertes por cáncer alrededor del mundo, la OMS ha reportado que el número de casos de muerte por esta enfermedad irá en aumento¹. Por esta razón, se buscan estrategias para el tratamiento de esta enfermedad. Recientemente, varios grupos de investigación han reportado efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata y han propuesto su uso potencial en la terapia oncológica, ya que reducen el contenido celular de ATP (trifosfato de adenosina) y causan daño mitocondrial de manera dosis-dependiente; además de inducir apoptosis por la vía mitocondrial asociada a la generación de especies reactivas de oxígeno y a la activación de JNK (*Jun amino-terminal cinasa*)². En diversos estudios se ha observado mayor sensibilidad por parte de células neoplásicas, sin embargo, el efecto de las nanopartículas de plata no es específico para las células de cáncer, pudiendo causar toxicidad sistémica y efectos adversos en los pacientes. El uso de nanotransportadores permite minimizar el daño sistémico al direccionar el efecto farmacológico al sitio de acción deseado, mediante una o ambas estrategias de direccionamiento: A) Direccionamiento pasivo, dado por el efecto de "Permeabilidad y Retención Aumentadas"; debido a que en los tumores, los vasos sanguíneos formados *de novo* presentan anomalías estructurales y funcionales

que reducen el flujo sanguíneo y favorecen la perfusión de los componentes del plasma al intersticio tumoral; bajo estas condiciones, aunadas al drenado linfático disminuido, se lleva a cabo una acumulación efectiva en la zona tumoral; y B) Direccionamiento activo; mediante la funcionalización de la superficie de los transportadores empleando sistemas ligando-receptor o antígeno-anticuerpo. Para lograr esto, los transportadores deben tener material biocompatible en su superficie que permita reducir la respuesta inmunológica, como el poli(etileno)glicol (PEG), un diámetro menor a 200 nm y un peso molecular mayor a 50 kDa, a fin de evitar su excreción glomerular³. Dentro de las estrategias de direccionamiento activo de los nanotransportadores se encuentran las lectinas, un grupo de glicoproteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos y que se unen de manera reversible y específica a residuos de polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos. En oncología, las lectinas han sido usadas para el diagnóstico y el tratamiento, incluyendo el direccionamiento de sistemas de liberación dirigida. Varias lectinas de origen vegetal han sido estudiadas y su eficacia ha sido comprobada en el tratamiento de cáncer, sin embargo, el mecanismo preciso del efecto antitumoral no es claro, aún cuando varios han sido propuestos, entre ellos: la reducción de la división celular, el incremento del número de macrófagos, el aumento de la susceptibilidad de las células tumorales al ataque inmunológico, etcétera⁴.

Procedimiento Experimental

Se sintetizaron nanopartículas de plata vía sol-gel, mediante la reducción de AgNO₃ con dextrosa, empleando gelatina como pasivante a 58 °C; posteriormente se nanoencapsularon en PEG mediante una modificación del método de "emulsión- evaporación del solvente"⁵ evaluando el efecto de los factores: pH, concentración de PEG y volumen de nanopartículas de plata en el diámetro hidrodinámico, mediante un DCC con $\alpha=1.68$. Los productos fueron evaluados por EDS, FT-IR (resultados no mostrados), MET y dispersión de luz dinámica.

Las líneas celulares de cérvix uterino: carcinoma epidermoide, Ca Ski (ATCC No. CRL-1550) y de adenocarcinoma, HeLa (ATCC No. CCL-2); fueron crecidas en el medio base RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino. Se evaluó, mediante citometría de flujo, la respuesta citotóxica a las nanopartículas de plata, libres y encapsuladas. Las células fueron teñidas con CFSE al 1%,



Memorias en extenso

en oscuridad, durante 15 min, se sembraron y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se cambió el medio y se adicionaron diferentes dosis del vehículo con gelatina y dextrosa; de nanopartículas de plata, de nanotransportadores cargados con nanopartículas de plata; solo el vehículo, y de cisplatino empleado como control positivo. El tratamiento se mantuvo en incubación a 37 °C durante 24 h. Las células fueron cosechadas, teñidas con IP durante 30 min y analizadas por citometría de flujo. Se evaluó mediante microarreglos de cDNA el efecto en la expresión genética inducido por la aglutinina del frijol de soya (SBA) con el fin de aportar al conocimiento del mecanismo de acción de esta proteína en la inducción de muerte celular y verificar su actividad en la línea celular HeLa, ya que se busca sinergizar la acción del nanotransportador con la de la proteína al emplearla como agente para el direccionamiento del nanotransportador. Para ello, se realizó una curva dosis respuesta de tratamiento empleando azul de tripano.

Resultados y Análisis

Se obtuvieron nanopartículas de plata de diámetro aproximado a 5 nm y nanotransportadores de diámetro hidrodinámico entre 70 y 200 nm, observando que el factor que mayor influencia tiene sobre el tamaño es la concentración de PEG, seguido por el volumen de nanopartículas de plata, el pH no afecta el resultado. Los diámetros menores se obtuvieron con 17 % de PEG y en los extremos superior e inferior del volumen de nanopartículas de plata empleados en el diseño experimental (Fig. 1 y 2). Las micrografías electrónicas mostraron resultados morfológicos que coinciden con los reportados en bibliografía para sistemas similares (Fig. 3).

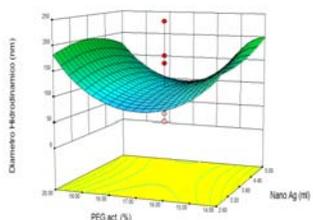


Figura 1. Superficie de respuesta del diámetro hidrodinámico de los nanotransportadores respecto al volumen de nanopartículas de plata y la concentración de PEG.

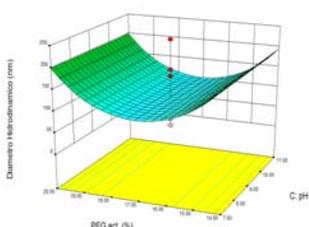


Figura 2. Superficie de respuesta del diámetro hidrodinámico de los nanotransportadores respecto al pH y la concentración de PEG.

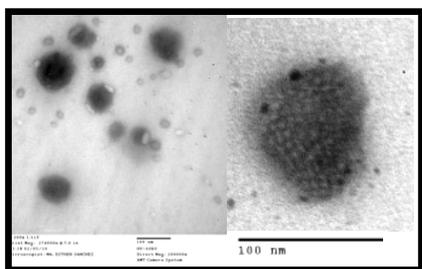
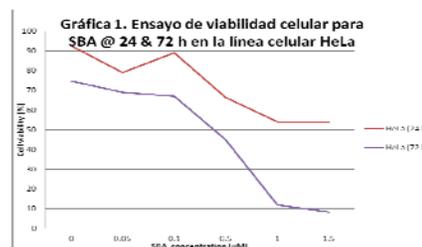


Figura 3. Nanotransportadores de nanopartículas de plata evaluados por TEM.

Mediante citometría de flujo se determinó que los vehículos no tienen efecto en la viabilidad celular, mientras que tanto las nanopartículas de plata como el nanotransportador con

nanopartículas de plata son citotóxicos de manera dosis-dependiente, induciendo hasta el 100% de muerte celular en las dosis más altas en las líneas celulares (resultados no mostrados).

Se determinó que la SBA causó daño a la membrana celular en ensayos de viabilidad (gráfica 1), comparando contra los controles: negativo y positivo -doxorubicina 0.5 ug/ml- (resultados no mostrados).



Empleando una dosis (no indicada), se evaluó el RNA extraído mediante el protocolo de QIAGEN, obteniendo resultados favorables en la calidad del RNA. Los cambios de expresión genética fueron evaluados en la plataforma de Affymetrix contra un control sin tratamiento que arrojó una relación de cambio en la señal mayor a 1 en 1326 genes, varios de ellos involucrados en los procesos de muerte celular. El estudio del efecto global de la SBA en la línea celular HeLa bajo las condiciones de tratamiento sigue en proceso, los datos serán corroborados mediante inmunquímica o RT-PCR para su publicación.

Conclusiones

-El pH no influye en el tamaño de los transportadores, mientras que los extremos de las concentraciones de nanopartículas de plata y la concentración media de PEG empleada en el diseño experimental favorecen tamaños menores de los nanotransportadores, siendo éste último el factor más importante.
-La SBA es una estrategia prometedora para el direccionamiento de los transportadores por su doble acción: especificidad (reportada previamente) y toxicidad, demostrada experimentalmente.

Agradecimientos

Agradecemos a la Secretaria de Investigación y Posgrado, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad de Cornell, al Dr. Richard Cerione y al Dr. Marc Antonyak por su apoyo a este trabajo.

Referencias

1. International Agency for Research on Cancer. Section of Cancer Information. *GLOBOCAN 2008*. [19 de 10 de 2010].
2. Arora S, *Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies*. *Toxicol Lett*, 179, 93-100 (2008).
3. Nishiyama N, e. a. *Current State, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery*. *Pharmacology and Therapeutics*, 112, 630-648. (2006).
4. Ohba H. and Bakalova R. *Relationships between degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines*. *Cancer Chemother Pharmacol*. 51: 451-458. (2003).