

EVALUACIÓN EN MODELOS IN VIVO DE LA EFECTIVIDAD DE NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

Eduardo San Martín Martínez¹, Rocío Casañas Pimentel^{1,2}, Marco A. Ramírez Salinas³, Exsal M. Albores Méndez¹

¹CICATA-IPN.

²CONACYT - Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada.

³Centro de Investigación en Computación del IPN.

esanmartin@ipn.mx, rgcasanaspi@conacyt.mx, mars@cic.ipn.mx, albores_09@hotmail.com

<https://doi.org/10.3926/oms.401.1>

San Martín Martínez, E., Casañas Pimentel, R., Ramírez Salinas, M. A. & Albores Méndez E. M. (2020). Evaluación en modelos *in vivo* de la efectividad de nanotransportadores de fármacos anticancerígenos en el tratamiento de cáncer de mama. En E. San Martín Martínez, M. A. Ramírez Salinas (Eds.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Barcelona, España: OmniaScience. 11-43.*

Resumen

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en las mujeres de todo el mundo y las cifras van en aumento. La medicina está evolucionando atacando los tejidos cancerosos sin comprometer tejidos sanos a través de la terapia dirigida, un tratamiento de mayor eficacia, ya que el fármaco actúa directamente en las células tumorales. Con ayuda de la nanomedicina se han realizado estudios que reportan efectividad citotóxica de nanopartículas que contienen fármacos antineoplásicos en líneas celulares de cáncer y en células normales. Para poder dirigir estas nanopartículas es necesario vectorizarlas con una molécula que sea afín a las células neoplásicas de tejidos mamarios. La aglutinina de soya (SBA) es una proteína del frijol de soya que realiza unión de tipo ligando/receptor con azúcares que forman parte de los receptores de la superficie de las células de algunos tipos de cáncer, incluyendo al de mama. Fue realizada la bioconjugación de nanopartículas cargadas de fármacos anticancerosos con aglutinina de soya, de manera efectiva por 8 h a 4 °C. La bioconjugación del nanotransportador con la SBA permitió reducir los valores de IC_{50} para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7. Fue desarrollado exitosamente un modelo murino de cáncer de mama con epítopes similares al cáncer de mama humano, triple negativo. Con los nanotransportadores funcionalizados cargados con fármacos que tienen el menor IC_{50} se realizarán los ensayos en modelos *in vivo* a los cuales se les ha inducido el cáncer de mama, evaluando el efecto en las zonas tumorales a través de imagenología con un sistema de análisis óptico de bioluminiscencia, fluorescencia y rayos X (IVIS Serie III). Para confirmar el efecto de los nanotransportadores con los fármacos se realizarán estudios histopatológicos de las zonas tumorales.

Palabras clave: Aglutinina de soya; Nanotransportadores; Cáncer de Mama; Nanomedicina; Nanopartículas de plata.

1. Introducción

Cáncer, es un término empleado para designar a un conjunto de enfermedades que se pueden presentar en diversas partes del organismo, cuyas características básicas son: el crecimiento celular descontrolado y la acumulación de múltiples alteraciones genéticas. El cáncer constituye una de las principales causas de muerte. En el 2012, en el mundo se presentaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y 8.2 millones de muertes derivadas de esta patología. Los tipos de cáncer que causan más muertes al año incluyen a los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon, próstata y mama [1].

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en la mujer, a nivel mundial [1]. En México, es un problema de salud pública de gran importancia, y es el cáncer ginecológico el que causa mayor número de muertes [2].

Existe una amplia gama de fármacos quimioterapéuticos que son activos en el cáncer de mama; para el tratamiento de primera línea se utilizan siempre los más potentes y seguros: los antraciclínicos (adriamicina y epirubicina) y los taxanos (paclitaxel y docetaxel). Desafortunadamente, la baja concentración del fármaco que alcanza los sitios tumorales, su rápida eliminación y su amplia distribución, hacen que las dosis terapéuticas de la terapia tradicional sean muy altas [3], lo que produce un envenenamiento sistémico, con efectos colaterales nocivos [2] que se manifiestan con náuseas y vómitos, anorexia, debilidad, cansancio, estomatitis, alopecia y fiebre, entre otros síntomas. Por otro lado, nuestro organismo es capaz de desarrollar resistencia a múltiples fármacos, lo que limita la efectividad del tratamiento. Finalmente, la mayoría de los fármacos antineoplásicos en la práctica clínica son de naturaleza apolar, por lo que su administración requiere del uso de solventes orgánicos, nocivos para el organismo. Debido a estas razones, diversos grupos de investigación a nivel internacional se encargan de desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama [3].

La nanomedicina ha demostrado un potencial invaluable en el tratamiento del cáncer. Este conjunto de herramientas ha permitido disminuir los efectos adversos de la quimioterapia e incrementar la acumulación del fármaco en la vasculatura tumoral. Diversas nanopartículas han sido diseñadas en su tamaño óptimo y sus características superficiales para incrementar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Éstas son capaces de transportar a los fármacos hacia las células de cáncer mediante transporte pasivo, utilizando las características del microambiente tumoral, como el efecto de permeabilidad y retención

incrementadas (EPR) [4], el cual se presenta debido a que los vasos sanguíneos en los tumores presentan una serie de modificaciones morfológicas y funcionales, dentro de las que destaca la falta de continuidad del epitelio vascular, dando lugar al paso de partículas con tamaños menores a los 600 nm; por otro lado, los vasos linfáticos se encuentran atrofiados, por lo que no les es posible drenar de manera adecuada el sitio tumoral [5]. Además del direccionamiento pasivo, actualmente se desarrollan estrategias de direccionamiento activo a través de ligandos o anticuerpos dirigidos a marcadores tumorales específicos, mejorando la especificidad de estas nanopartículas terapéuticas. Se sabe que las partículas biocompatibles con tamaño menor a 200 nm pasan desapercibidas por el sistema retículo-endotelial (RES), prolongando su tiempo de circulación [4].

En años recientes, se han desarrollado algunos nanotransportadores para el tratamiento del cáncer de mama. El paclitaxel fue nanoparticulado y direccionado con albúmina, adquiriendo el nombre comercial de Abraxane. Este medicamento está indicado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. La Doxorubicina fue encapsulada en liposomas, bajo el nombre comercial de Myocet, y está indicada para el cáncer de mama recurrente, y la misma Doxorubicina, encapsulada en liposomas PEGilados, se encuentra a la venta con el nombre de Doxil/Caelyx, también indicada para el cáncer de mama recurrente. Existen diversas moléculas que pueden ser empleadas para el direccionamiento activo de las nanopartículas poliméricas transportadoras de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama. Dos importantes, que han sido explotadas con eficacia, son 1) la albúmina, que basa su función en la acumulación del fármaco en el sitio tumoral a través de la acción endocítica de la caveolina, y 2) el trastuzumav, anticuerpo monoclonal humanizado que se une de manera específica al receptor de HER2 [3]; sin embargo, no son los únicos medios para direccionar el efecto farmacológico al cáncer de mama. La aglutinina de soya (SBA, *soybean agglutinin*) es un candidato potencial para este trabajo.

La SBA es una glicoproteína tetramérica que reconoce de manera específica a la N-acetilgalactosamina y a la β -D-galactosa; aunque también se une a Ca^{2+} y a Mn^{2+} , en menor medida. Su punto isoeléctrico es cercano a 6.0. El diámetro hidrodinámico de la SBA es función, entre otras cosas, de la temperatura, la concentración y el pH. A pH cercano a 1, la SBA se desnaturaliza, mientras que entre 2 y 2.5 se encuentra en forma de monómero, con un diámetro hidrodinámico de 3 nm, pero que más allá de 2.5, la estructura tridimensional de la proteína es tetramérica, con un diámetro hidrodinámico cercano a los 4 nm,

cuando se emplea una solución de 0.8 mg/ ml de buffer AGH10 (10 mM acetato/10 mM glicina/10 mM HEPES con 15 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ y 154 mM NaCl) at 25°C [6].

La SBA ha mostrado tener un valor pronóstico en el cáncer de mama, ya que entre mayor es su afinidad por el tejido, el paciente tiene un peor pronóstico. Su interacción es, por tanto, un indicio de la malignidad tumoral, lo cual se debe a que el patrón de expresión de azúcares en la superficie de las células se ve afectado conforme aumenta el potencial metastásico de las mismas, ya que la interacción de la célula con la matriz extracelular está mediada fuertemente por las moléculas de superficie de membrana [7]. En un estudio realizado con 130 cortes histológicos de carcinoma mamario, se encontró que sólo el 5 % fueron completamente negativos a la interacción con SBA teñida con fluoresceína, mientras que las células madre hematopoyéticas (un tejido comprometido en la mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos) fueron completamente negativas. El grupo demostró que la SBA se une a la superficie de las células MDA-MB-231 y las células MCF7, dos importantes líneas celulares de carcinoma mamario [8].

En los últimos años, varios grupos de investigación han sugerido el uso de las nanopartículas de plata para el tratamiento de cáncer. AshaRani *et al.* [9], evaluaron la toxicidad de nanopartículas de plata cubiertas con almidón en la línea celular de fibroblastos de pulmón humano (IMR-90) y en células de glioblastoma humano (U251), observando que las nanopartículas de plata redujeron el contenido celular de ATP, causando daño mitocondrial e incrementando la producción de ROS, ambos de manera dosis-dependiente, siendo el daño al ADN, más prominente en las células de cáncer. El tratamiento con nanopartículas causó paro del ciclo celular en la fase G(2)/M. Asimismo, Wu *et al.* [10] reportaron que las nanopartículas de plata con diámetro promedio de 6 nm, suprimen eficazmente la proliferación de células de leucemia humana (K562) en función de la dosis y el tiempo; sugiriendo su posible uso en la terapéutica del cáncer [10]. Por otro lado, Carlson *et al.* [11] evaluaron la interacción de nanopartículas de plata de 15, 30 y 55 nm en macrófagos alveolares, encontrando acumulación intracelular significativa a las 24 h de exposición con dosis altas de nanopartículas y disminución en la viabilidad al incrementar la dosis de nanopartículas de 15 y 30 nm (10-75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los autores sugirieron que la toxicidad de las nanopartículas de plata es mediada por estrés oxidativo. Hsin *et al.* [12] reportaron que las nanopartículas de plata inducen apoptosis en fibroblastos NIH3T3 por la liberación del citocromo c en el citosol y la translocación de Bax (proteína perteneciente a la familia de

Bcl-2, reguladores de la apoptosis y del ciclo celular) a la mitocondria. La inducción de apoptosis se encontró asociada a la generación de ROS y la activación de JNK (Jun N-terminal kinase). En las células resistentes a las nanopartículas de plata HCT116, encontraron sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas; estos autores concluyeron que las nanopartículas de plata inducen apoptosis por la vía mitocondrial. Diversos agentes antineoplásicos fundamentan su acción vía apoptosis activada por la generación de ROS, entre ellos: la vinblastina, el cisplatino, la mitomicina C, la doxorubicina, la camptotecina, la inostamicina y la neocarzinostatina [13].

Por lo anterior, el estudio de la factibilidad terapéutica de las nanopartículas de plata debería continuarse bajo condiciones de toxicidad dirigida al sitio de acción deseado, ya que la toxicidad de las nanopartículas de plata no es específica para las células de cáncer.

Existen múltiples métodos que permiten la síntesis de nanopartículas de plata, entre ellos se pueden mencionar: la reducción química de sales de plata, la reducción asistida por radiación, la reducción térmica o fotónica, la descomposición termal de compuestos de plata, la ruta verde y el método del poliol, entre otros [14]. El método del poliol consiste en la utilización del PEG y otros dioles para reducir la plata y dar lugar a la formación de nanopartículas. El PEG puede actuar como un agente reductor y estabilizante, en función de su peso molecular, entre mayor es éste, mayor es su actividad. Las partículas sintetizadas por este método son estables a temperatura ambiente por meses. Para la síntesis de nanopartículas de plata por este método, el incremento en la concentración del AgNO_3 favorece la cristalinidad y el aumento de tamaño de las nanopartículas de plata [15].

2. Materiales y métodos

2.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de plata por el método del poliol con algunas modificaciones al método reportado por Luo *et al.* [15]. Para ello, se adicionó a un matraz bola la cantidad de polietilenglicol (PEG) (Sigma-Aldrich) indicada en cada experimento, se llevó a la temperatura deseada y se adicionó la cantidad de AgNO_3 (Sigma-Aldrich) indicada en cada experimento. La reacción se mantuvo en agitación magnética el tiempo indicado.

Las nanopartículas de plata fueron disueltas en diclorometano, los espectros de absorción óptica de las soluciones de nanopartículas de plata fueron obtenidos en un intervalo de longitud de onda de 300-800nm, empleando un espectrofotómetro UV-Vis Cary de Varian. El tamaño de las nanopartículas de plata fue determinado por microscopía electrónica de transmisión (TEM, JEM-1010 JEOL Japan) sobre rejillas de cobre de malla 200 con recubrimiento de carbono.

2.2 Síntesis y caracterización de los nanotransportadores de nanopartículas de plata

La síntesis de los nanotransportadores fue desarrollada por autoensamble; para ello, diferentes concentraciones del PEG con las nanopartículas de plata se adicionaron a una solución acuosa al pH indicado para cada experimento. Posteriormente se homogeneizaron con vórtex por 30 s y se sometieron a baño ultrasónico durante 10 min. Las partículas se mantuvieron en maduración a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada experimento. Los agregados grandes fueron eliminados por filtración a 0.22 μm . En todos los casos, excepto en las pruebas *in vitro*, se ajustó el pH de la solución obtenida a fin de darle estabilidad a la solución. Las muestras fueron caracterizadas mediante TEM y dispersión de luz dinámica a 25 °C (DLS, Zetasizer, Malvern Instruments).

2.3 Bioconjugación del nanotransportador con la SBA comercial

La bioconjugación del nanotransportador y la SBA se realizó ajustando el pH de la solución de nanotransportadores a 5.8 y se adicionaron las cantidades de SBA disuelta en PBS pH 7.4 (1 mg/ml) indicadas para cada experimento, la reacción de conjugación se desarrolló a 4 °C durante 24 h. Los nanotransportadores conjugados fueron analizados mediante DLS y TEM.

2.4 Ensayos de citotoxicidad

Se emplearon para el estudio: las líneas celulares de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) y MCF7 (ATCC® HTB-22™), así como la línea celular no tumorigénica MCF 10A (ATCC® CRL-10317™). Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO), suplementado con 5 % de suero fetal

bovino (FBS, Invitrogen) a pH 7.0, mientras que la línea celular MCF 10A fue cultivada en medio DMEM-F12 suplementado con 10 % de FBS, factor de crecimiento epidérmico (EGF, 100 mg/ml, Sigma), insulina (100 mg/ml, Sigma) e hidrocortisona (1 mg/ml, Sigma). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C en atmósfera controlada al 5 % de CO₂.

Para los estudios de toxicidad de los nanotransportadores no conjugados se pesó la cantidad necesaria de PEG con nanopartículas de plata requerida para cada experimento y se disolvió en medio de cultivo, el autoensamble y la homogeneización de las partículas se realizaron mediante vortexeo por 30 s y el pase de la solución en una jeringa de insulina 10 veces; la solución obtenida fue filtrada en esterilidad con filtro de 0.22 µm y aplicada a las células previamente sembradas en placas de 96 pozos, como se indica más adelante. Se probaron en las tres líneas celulares, cuatro dosis de nanotransportadores de nanopartículas de plata (0.0008 g/ml; 0.0040 g/ml; 0.0200 g/ml; y 0.1000 g/ml). En la Tabla 1 se indica la concentración de plata y de PEG para cada tratamiento; para realizar estos estudios se emplearon como controles: PEG 8000 Da, paclitaxel 0.293 µM (control +) y células sin tratamiento (control -).

Tabla 1. Composición de las muestras de PEG y PEG con nanopartículas de plata empleadas para determinar la toxicidad de las nanopartículas de plata.

| Dosis | Concentración de PEG | | Concentración de PEG y plata | |
|-------|----------------------|-------|------------------------------|---------|
| | (µM PEG) | Dosis | (µM PEG) | (µM Ag) |
| C1 | 99.68 | D1 | 99.68 | 23.54 |
| C1.3 | 219.17 | D1.3 | 219.17 | 51.79 |
| C1.5 | 298.84 | D1.5 | 298.84 | 70.62 |
| C1.75 | 398.42 | D1.75 | 398.42 | 94.16 |
| C2 | 498.41 | D2 | 498.41 | 117.70 |
| C3 | 2492.06 | D3 | 2492.06 | 588.00 |
| C4 | 12460.30 | D4 | 12460.30 | 2943.40 |

Los nanotransportadores autoensamblados y conjugados fueron disueltos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo y filtrados con membranas estériles con tamaño de poro de 0.22 µm. Se emplearon los siguientes controles: 1) vehículo, muestras de PEG disuelto en medio a las mismas concentraciones que las empleadas para los nanotransportadores; 2) el medio de cultivo solo, y 3) medio de cultivo con paclitaxel 0.293 µM. Adicionalmente, se preparó una solución de SBA comercial (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) en PBS pH 7.4; esta solución

fue filtrada en esterilidad y empleada en los ensayos de toxicidad a diferentes concentraciones (0.5-2.0 μM); para estos estudios se emplearon los volúmenes de PBS correspondientes a cada muestra como controles.

La toxicidad inducida por las muestras fue determinada por la técnica colorimétrica MTT. Para realizar el estudio, se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano, 7 000 células por pozo para los ensayos con MDA-MB-231 y 10 000 células por pozo para los ensayos con MCF7 y MCF 10A, adicionando 100 μl de medio de cultivo por pozo. Las células se mantuvieron en incubación durante 24 h a fin de permitir la adherencia de las células a la superficie de la placa. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron los diferentes tratamientos (según se indique en cada experimento). Se mantuvo el tratamiento en incubación durante 24 h. A continuación, se adicionaron a cada pozo 0.1 mg de MTT y se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C, en oscuridad. Una vez completado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100 μl de DMSO. Las muestras fueron analizadas por espectroscopia UV-Vis en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan Ms) a 570 nm. Los diferentes tratamientos fueron comparados con el control negativo que empleó únicamente medio; a partir de éste, se calculó el porcentaje de viabilidad celular.

2.5 Purificación de la aglutinina de soya

2.5.1 Obtención del material vegetal

Las semillas de soya (*Glycine max*) fueron obtenidas, para el aislamiento y purificación de la lectina, en el mercado Argentina, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México.

2.5.2 Molienda

Las semillas de soya fueron pesadas y molidas en un molino de discos (The Bauer Bros. Co, Springfield Ohio – Brantford, Ontario) la distancia entre los discos fue de 20 μm , seguidamente la muestra se pasó por molino de martillo con malla (Raymond, Laboratory Mill) para separar los granos triturados de mayor tamaño y volver a pasarlos por el molino de discos con las mismas condiciones iniciales. El producto de molienda se dejó enfriar y secar.

2.5.3 Tamizado

La harina obtenida de las semillas de soya molidas fue procesada en una columna de tamices (Montiel Inoxidables México, MONTINOX). Se utilizaron 5

tamaños de abertura descritos en la Tabla 2. Se seleccionó la harina retenida por la malla N°. 80, de 177 μm de abertura.

Tabla 2. Tamaño de abertura de los tamices utilizados.

| Abertura (μm) | Pulgadas de Apertura | Número U.S. |
|----------------------------|----------------------|-------------|
| 420 | 0,1650 | 40 |
| 250 | 0,0098 | 60 |
| 177 | 0,0070 | 80 |
| 149 | 0,0059 | 100 |
| 125 | 0,0019 | 120 |

2.5.4 Desgrasado

Una vez realizada la clasificación granulométrica, se seleccionó la harina que quedó retenida en la malla número 80. Se pesaron 12 ± 1 g de muestra en un cartucho de papel filtro para ser desgrasada en un equipo de Soxhlet durante seis horas, utilizando hexano como solvente.

2.5.5 Extracción de Proteínas (Globulinas)

Para la extracción de proteínas, se siguió el protocolo establecido por Larsson & Mattiasson [16] con algunas variantes. Una mezcla de una parte de harina de soya desgrasada (g) y cinco partes de NaCl 0,15 M (ml) se puso en agitación por 3 h a temperatura ambiente y 1 h a 4°C. Se centrifugó (13921 x g, +8°C, 10 minutos), resultando en un sobrenadante claro.

2.5.6 Precipitación de Proteínas por “Salting Out”

Se adicionó al sobrenadante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40 % de saturación y se llevó a cabo la precipitación por 1 hora a 4°C. La muestra se centrifugó a 13921 x g (Marca Sigma 2-16; rotor 12141), 8°C, 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó sulfato de amonio por encima del 80 % de saturación, la mezcla se agitó por 2 h a 4°C, y posteriormente fue centrifugada a 13921 x g, 8°C, 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue disuelto en dos veces su volumen en una solución de NaCl 0,15 M. El pellet solubilizado se dializó durante la noche en contra de una solución de NaCl 0,15 M, empleando una membrana de 12-14 kD de MWCO (Spectra/Por Dialysis Tubing, SpectrumLabs). La fracción final dializada obtenida se utilizó para la cromatografía de afinidad, algunos detalles de la obtención de proteínas están indicados en la Figura 1.

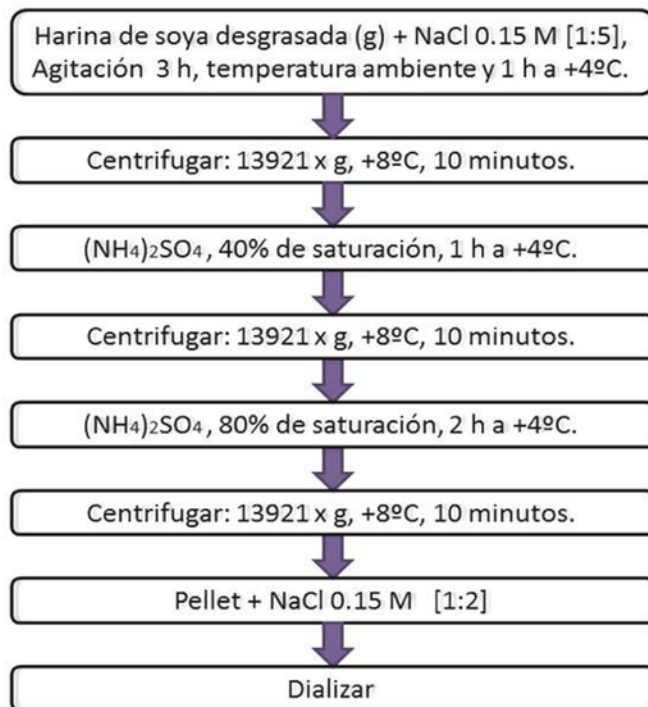


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de precipitación de Proteínas.

2.5.7 Cuantificación de Proteínas Totales

Se realizó la determinación cuantitativa de la concentración de proteínas totales siguiendo el Método descrito por Lowry [17]; utilizando una solución de albúmina bovina (1mg/ml) para construir la curva tipo y determinar la concentración de las proteínas. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific™ Multiskan FC microplate photometer) a una longitud de onda de 750 nm, como indica el método.

2.5.8 Cromatografía de afinidad

2.5.8.1 Preparación de la matriz de afinidad

El método elegido para la preparación de adsorbentes para cromatografía de afinidad, consiste en la adición de bisoxiranos (1,4-butanodiol diglicidil éter) para la introducción de grupos reactivos de oxiranos en la agarosa y para simultáneamente estabilizar el gel por entrecruzamiento. La activación de la matriz polimérica (**P-OH**) se lleva a cabo como se muestra en la Figura 2.

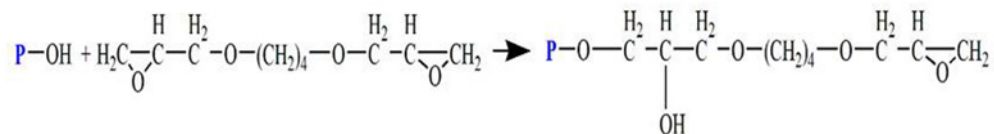


Figura 2. Reacción de activación de matriz de agarosa con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter. Modificado de [18].

El grupo amino contenido en los componentes **R-NH₂** es acoplado de acuerdo con la reacción descrita en la Figura 3:

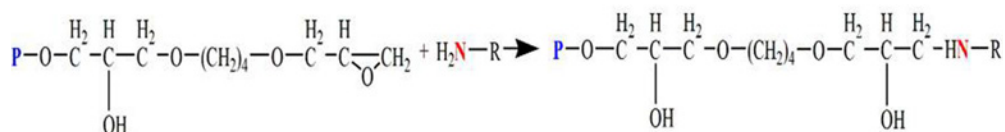


Figura 3. Reacción de acoplamiento del ligando a la de matriz de agarosa. Modificado de [18].

Se trabajó con 5 g de Sefarosa CL-4B prehidratada (Sigma-Aldrich, USA), a la cual se le retiró el exceso de líquido mediante centrifugación a 4779 x g durante 5 minutos.

A continuación se activó la matriz por incubación (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), a 180 rpm, 25°C, durante toda la noche, con 5 ml de NaOH (0,6 M) conteniendo 10 mg de NaBH₄ (Sigma-Aldrich, USA) y 2,5 ml de 1,4-butanodiol-diglicidil-éter (Sigma-Aldrich, USA).

Para el acoplamiento del ligando de afinidad se siguió el protocolo descrito por Vretblad [18], con modificaciones menores. Después de su activación, el gel fue lavado exhaustivamente con NaOH (0,1 M) y posteriormente fue mezclado con 150 mg de D-N-Acetil-Galactosamina (Sigma-Aldrich, USA) y 5 ml de NaOH (0,1 M). El acoplamiento se llevó a cabo por 48 h en una incubadora (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), en agitación a 100 rpm y 45°C.

La matriz se lavó con buffer Tris-HCl (0.1M, pH=7.5), y se mantuvo en el buffer a 4°C por 1 h, antes de ser lavada con agua destilada, Tris-HCl 0.05M (pH 8.0), buffer citrato 0.05M (pH 4.0) y finalmente con solución de NaCl 0.15 M.

El gel se almacenó en una solución de etanol al 20 % en refrigeración a 4-8°C. El gel se caracterizó por FTIR antes de ser activado, después de ser activado y después de su acoplamiento con el ligando.

El gel de afinidad, en un volumen de 4 ml, se empacó en una columna de borosilicato y se llevó al equilibrio con una solución salina de NaCl 0.15 M a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min.

2.5.8.2 Procedimientos de la Cromatografía de Afinidad

Se inyectaron a la columna 5 ml de la muestra de proteínas purificadas del frijol de soya, a la misma velocidad de flujo (2.5 ml/min) empleada para la inyección de la fase móvil. A partir de entonces, la solución salina se bombeó a través de la columna, hasta que la absorbancia del eluato alcanzó un valor de cero a 280 nm. La elución de las proteínas adsorbidas se realizó mediante el intercambio de la solución salina con una solución de galactosa (25 mg/ml en solución de NaCl 0.15 M).

2.5.9 *Espectroscopia FTIR*

La sepharosa CL-4B, el producto activado con el grupo epoxi y el producto conjugado con la N-acetil galactosamina, fueron evaluados mediante espectroscopia FTIR (Cary 630, Agilent Technologies), con el fin de corroborar que las reacciones se llevaron a cabo de manera satisfactoria.

2.5.10 *Electroforesis*

La masa molecular de las subunidades de las lectinas fue estimada por electroforesis SDS-PAGE (10 %). Las muestras de cada etapa de purificación de la proteína fueron mezcladas con buffer de muestra y cargadas a los pocillos del gel. Una vez corroborada la presencia de SBA en las muestras dializadas del salting out, se procedió a realizar la cromatografía de afinidad y recolectar las fracciones en las que el detector a 280 nm presentaba picos de absorbancia.

Los canales electroforéticos fueron cargados con un control negativo (muestra de albúmina bovina), un control positivo (muestra SBA, de Sigma-Aldrich, USA), marcadores de peso molecular, los productos dializados del salting out y las fracciones de la cromatografía de afinidad en donde el detector UV-Vis presentó picos de absorbancia (Fracción 3 y Fracción 7) (Tabla 3).

La corrida electroforética se trabajó en las siguientes condiciones: 80 V, 30 mA, 2 W, 2 h. Después de la corrida, se retiraron los geles y se lavaron con abundante agua destilada. Los geles se tiñeron con Blue Brilliant (Sigma-Aldrich, USA) para hacer visibles las bandas. Luego se dejaron en agitación a 50 rpm en agua destilada, en una incubadora (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), para ser desteñidos.

Tabla 3. Muestras y controles cargados en los canales electroforéticos.

| N° Pocillo | Muestra | Descripción |
|------------|-------------|--|
| 1 | MW | Marcador de Peso Molecular (SigmaMarker™, mol wt 36,000-200,000 Da, Sigma-Aldrich) |
| 2 | D1 | Muestra dializada después del salting out. |
| 3 | D2 | Muestra dializada después del salting out. Réplica 1. |
| 4 | D3 | Muestra dializada después del salting out. Réplica 2. |
| 5 | D4 | Muestra dializada después del salting out. Réplica 3. |
| 6 | D5 | Muestra dializada después del salting out. Réplica 4. |
| 7 | T1 | Fracción 7, cromatografía de afinidad. |
| 8 | T2 | Fracción 3, cromatografía de afinidad. |
| 9 | Control (+) | SBA (Sigma-Aldrich, USA) |
| 10 | Control (-) | Albúmina de Suero Bovino (Merck Millipore,) |

2.6 Bioconjugación

2.6.1 Caracterización de SBA y muestra purificada

Se evaluó el potencial Z de la SBA comercial y la muestra purificada en un rango de pH de 4 a 8 mediante dispersión de luz dinámica a 25 °C (Nano Zetasizer ZS, Malvern Instruments).

2.6.2 Proceso de bioconjugación

Se tomó un volumen de nanotransportadores y un volumen de solución de SBA (1mg/ml) en una proporción de 9.24:5.47, con base en la IC₅₀ de los nanotransportadores de AgNPs en la línea celular MDA-MB-231 obtenida en los estudios anteriormente descritos (sección 2.4). La muestra se mantuvo en agitación (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark) a 150 rpm por 8 h, a una temperatura de 9°C, pH 5.8.

2.7 Establecimiento del modelo murino de cáncer de mama

La línea celular de cáncer de mama de ratón 4T1 fue adquirida de la ATCC (CRL-2539); de acuerdo con el proveedor, el modelo animal del tumor representa al cáncer de mama humano en estadio clínico IV. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (ATCC) suplementado con FBS al 10 %, en atmósfera

húmeda a 37 °C, 5 % CO₂. Se preparó una suspensión con 2500 células/μL. Se tomaron 20 μL de la suspensión celular y se inyectaron en la cuarta almohadilla mamaria de ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad, n=6. Los animales se mantuvieron en observación en el bioterio del Centro Militar de Ciencias de la Salud.

Se obtuvo tejido tumoral mediante autopsia al ratón tipo BALB/c de 12 semanas de edad, con un mes de evolución tras la inoculación vía subdérmica con células tumorales de 4T1. Se realizó estudio histopatológico mediante tinción H y E y el estudio inmunohistoquímico para receptores hormonales (estrógenos y progesterona), Cerb-B2, p53, ki-67 y CD-34.

3. Resultados y discusión

3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata

Se realizó un primer estudio para la síntesis de nanopartículas de plata, empleando PEG de 4600 Da (resultados no mostrados), en donde evaluó el efecto de la temperatura (70-90 °C), de la cantidad de AgNO₃ (0.5-2.5 % peso) y del tiempo de reacción (30-90 min), encontrando que la mejor temperatura de síntesis es 70 °C, debido a que el plasmón superficial de las muestras fue más definido y estrecho. Por su parte, se encontró que la cantidad adecuada de AgNO₃ a emplearse en la síntesis es de 0.5 % peso, debido a que no es posible disolver por completo cantidades superiores de la sal en el PEG. Por su parte, el incremento en el tiempo de síntesis de 30 a 90 min indujo un incremento en el ancho de pico del plasmón, indicando un aumento en la dispersión de tamaño de las partículas.

A continuación, se procedió con una comparación de la respuesta de síntesis con PEG de 4600 Da y PEG de 8000 Da con 0.5 % peso de AgNO₃, 70 °C a 30, 60, 90, 120 y 150 min de reacción, encontrando que para el PEG de 4600 Da (Figura 4A), el aumento en el tiempo de reacción favorece el crecimiento de las nanopartículas de plata, observado por el ancho de banda y el sitio de origen de la deflexión de la gráfica; además, se muestra un corrimiento del λ_{\max} hacia la derecha. Por otro lado, se observó que el PEG de 8000 Da (Figura 4B), favorece la síntesis de las nanopartículas de plata con un plasmón superficial bien definido a partir de los 60 min, la intensidad de la señal aumentó con el tiempo, indicando la formación de más nanopartículas de plata, pero no el crecimiento de éstas, ya que se mantuvo el ancho de banda y el sitio de origen de la deflexión de la gráfica

hasta los 120 min de reacción. A 150 min se observó un cambio brusco en el comportamiento de la gráfica que sugiere el aumento del tamaño de las nanopartículas. Se decidió trabajar con PEG de 8000 Da ya que su espectro sugiere la formación de nanopartículas de plata homogéneas y de tamaños menores, el tiempo de síntesis seleccionado fue de 120 min para maximizar la conversión de la mayor cantidad de sal de plata a nanopartículas, sin afectar de forma importante el tamaño (véanse las Figuras 4C y 4D).

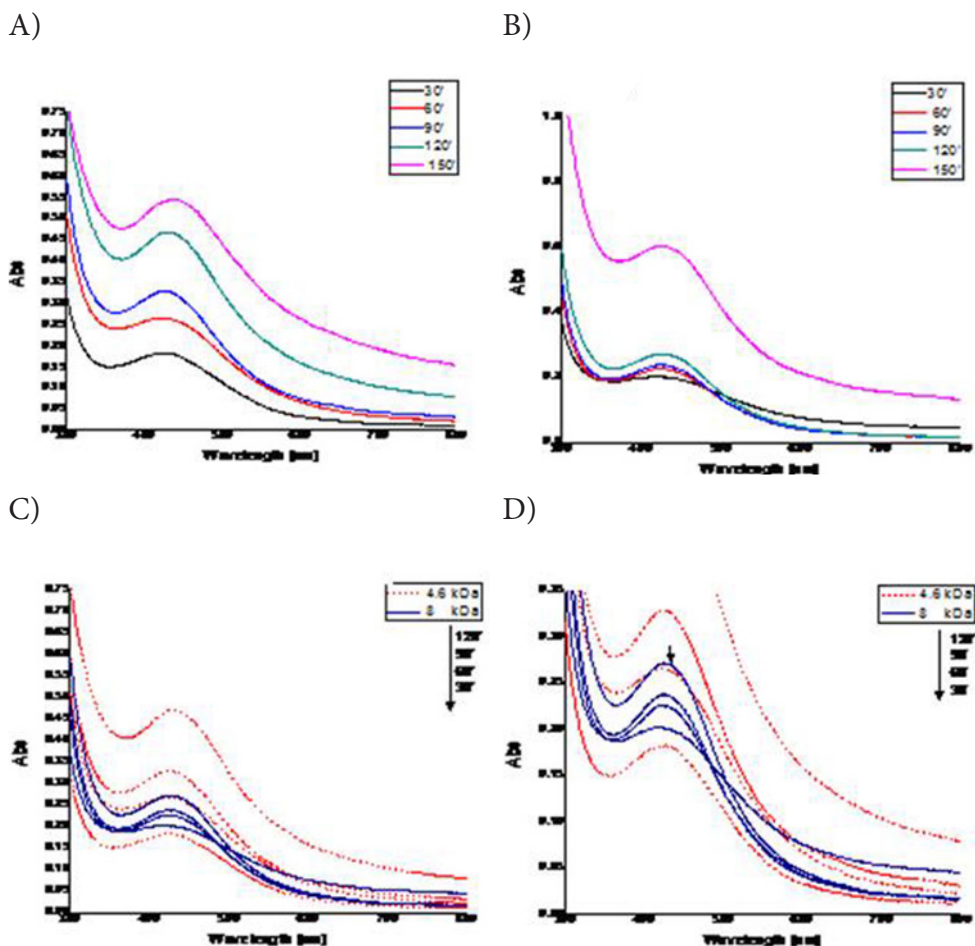


Figura 4. Espectros UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de plata con A) PEG de 4600 Da y B) 8000 Da, en C) y D) se muestran ambos pesos moleculares, donde D) es un acercamiento de C).

Se eligieron las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata para éste método con PEG de 8000 Da, a 120 min, 70 °C y 0.5 % peso de AgNO_3 . Esta

muestra fue caracterizada por MET de alta resolución. La caracterización microscópica de las nanopartículas se realizó diluyendo a las nanopartículas de plata embebidas en el PEG en cloroformo. El diámetro medio obtenido fue de 7.3 ± 3.2 nm (véanse las Figuras 5A y 5B).

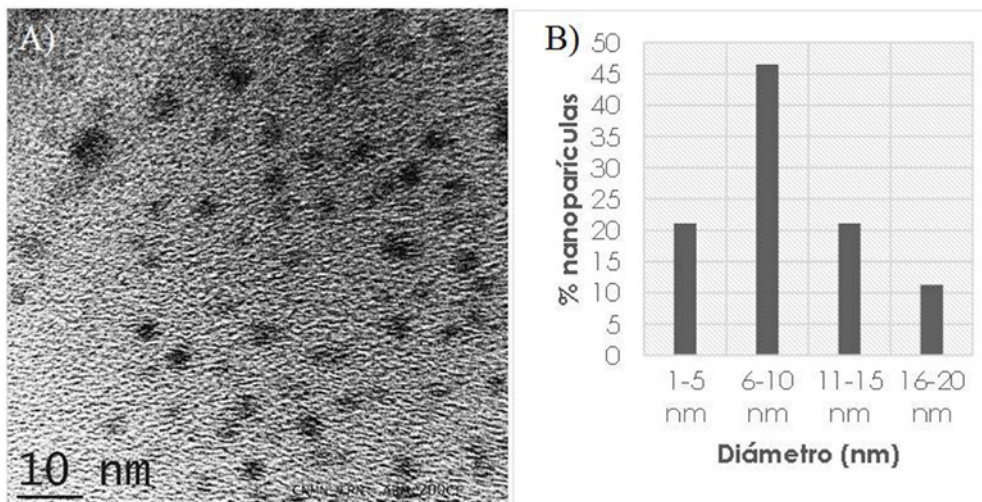


Figura 5. Tamaños de las nanopartículas de plata A) micrografía electrónica de transmisión de alta resolución y B) histograma de frecuencias del diámetro de partícula.

3.2 Síntesis y caracterización de los nanotransportadores de nanopartículas de plata

Se realizó un estudio de mezclas para conocer las condiciones de formación de nanotransportadores con tamaño homogéneo menor a 200 nm; para ello, se propuso la síntesis de muestras en agua desionizada, agregando del 0.1 al 10 % peso de nanopartículas de plata con PEG (peso total=10 g), de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 5); con posterior vortexeo 30 s y ultrasonido a 25 kHz. Los nanotransportadores se dejaron madurar durante 72 h y se realizó centrifugación a 4000 rpm durante 30 min, se recuperó el sobrenadante y se dejó madurar durante 48 h.

Se realizaron estudios de tamaño de partícula, filtrando a $0.45 \mu\text{m}$ previo al análisis de dispersión de luz dinámica y potencial zeta. Sólo la corrida 1 fue estable a corto plazo, con diámetro de partícula de 100 nm, homogéneo y un potencial zeta de -17.76 mV, lo cual indica que la suspensión no es estable a largo plazo, ya que no supera los ± 30 mV, pero da lugar a la reacción con el grupo amino de la proteína de funcionalización.

Tabla 5. Diseño experimental para la síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata por autoensamble.

| Std | Run | PEG-nanoAg % peso | Agua % peso |
|-------|-------|----------------------|----------------|
| 6.00 | 1.00 | 1.48 | 98.52 |
| 4.00 | 2.00 | 2.84 | 97.16 |
| 1.00 | 3.00 | 0.10 | 99.90 |
| 9.00 | 4.00 | 3.94 | 96.06 |
| 11.00 | 5.00 | 0.10 | 99.90 |
| 10.00 | 6.00 | 10.00 | 90.00 |
| 3.00 | 7.00 | 7.26 | 92.74 |
| 7.00 | 8.00 | 8.61 | 91.39 |
| 2.00 | 9.00 | 10.00 | 90.00 |
| 12.00 | 10.00 | 10.00 | 90.00 |
| 14.00 | 11.00 | 7.26 | 92.74 |
| 8.00 | 12.00 | 6.11 | 93.89 |
| 5.00 | 13.00 | 5.01 | 94.99 |
| 13.00 | 14.00 | 0.10 | 99.90 |

Masa total 10.0 g

Por lo anterior, se realizó una nueva corrida con 1.48 % peso de nanopartículas de plata en PEG, con el fin de mejorar tanto el tamaño de partícula como el potencial zeta, para ello se varió el pH de la muestra después de la síntesis. El punto isoeléctrico de la aglutinina de soya es cercano a 6, por lo que para su conjugación se requiere que ésta se encuentre con carga positiva, mientras que el nanotransportador tendrá que presentar un potencial zeta negativo para que de esta manera se genere una atracción que permita la bioconjugación del nanotransportador con la aglutinina. Debido a que el pH de la muestra, después de la síntesis fue de 5.2 y de acuerdo con la teoría, el potencial deberá reducir su valor conforme la muestra aumenta su pH, los nuevos valores de pH a probar, después de la síntesis del nanotransportador, fueron: 6.0 ± 0.2 , 7.0 ± 0.2 , 8.0 ± 0.2 y 9.0 ± 0.2 .

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 6; como se puede observar, el tamaño del nanotransportador no varió de manera considerable con el cambio de pH; en la tabla se indica el diámetro hidrodinámico, el valor promedio máximo en la campana de distribución del gráfico de intensidad correspondiente a cada experimento, las lecturas se hicieron por triplicado; los

valores para el PDI, en todos los casos, indicaron que las muestras presentaron significancia estadística ($p < 0.05$) y que no hay efecto del pH en la dispersión de tamaños de nanotransportadores. Sin embargo, el valor del potencial zeta sí se vio afectado con el cambio de pH, debido a que éste es el factor más importante en la determinación del valor del potencial zeta de una muestra. La muestra sintetizada a pH de 9.0 ± 0.2 teóricamente presenta estabilidad a largo plazo a 25°C . Esta muestra (en seco) fue caracterizada por TEM, encontrando que son estructuras esféricas con diámetro cercano a los 100 nm. La imagen permite observar la diferencia de densidad electrónica entre el PEG y la plata. Se observa una disposición aleatoria de la plata en el interior de la red polimérica (véase la Figura 6).

Tabla 6. Diámetro y potencial zeta de los nanotransportadores sintetizados por el método del poliol.

| Corrida, pH | Diámetro (nm) | PdI | Potencial Z (mV) |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| 1, 5.0 ± 0.2 | 158.76 ± 2.51 | 0.25 ± 0.00 | -17.76 ± 3.76 |
| 1, 6.0 ± 0.2 | 131.10 ± 1.90 | 0.20 ± 0.00 | -17.90 ± 2.30 |
| 1, 7.0 ± 0.2 | 145.50 ± 3.30 | 0.20 ± 0.01 | -17.10 ± 0.70 |
| 1, 8.0 ± 0.2 | 154.60 ± 3.00 | 0.24 ± 0.00 | -24.00 ± 0.10 |
| 1, 9.0 ± 0.2 | 143.50 ± 2.30 | 0.24 ± 0.01 | -36.20 ± 4.30 |

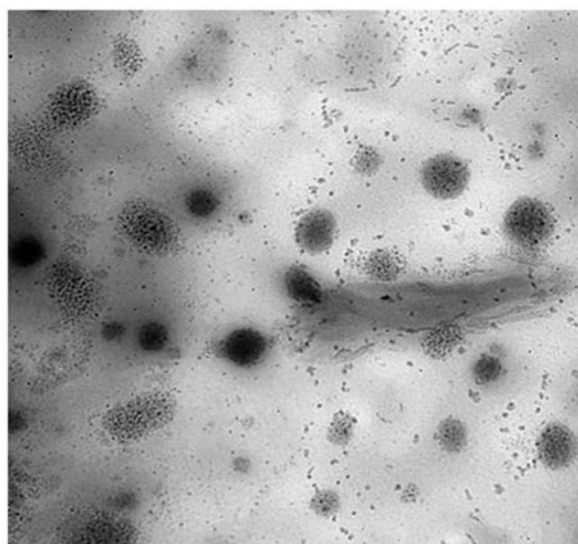


Figura 6. TEM de los nanotransportadores de nanopartículas de plata sintetizados por autoensamble.

3.3 Ensayos de citotoxicidad de los nanotransportadores de nanopartículas de plata

En la línea celular MDA-MB-231 (véase la Figura 7A), el control negativo mostró un valor de 100 % de viabilidad, ya que estas muestras corresponden a células sin tratamiento. Es a partir de estos valores que se determina la toxicidad de los otros tratamientos; el control positivo (paclitaxel 0.293 μM) al ser un agente anti-neoplásico indujo una disminución en la viabilidad celular del 20 % a las 24 h de tratamiento. Cuando se comparó la toxicidad del PEG contra estos dos controles, se observó que la dosis C1 (99.68 μM PEG), la dosis C2 (498.41 μM PEG) y la dosis C3 (2492.06 μM PEG) no mostraron un efecto tóxico significativo, mientras que la dosis C4 (12460.30 μM PEG) mostró una toxicidad importante a las 24 h de tratamiento, alcanzando una disminución del 50 % de viabilidad. No se busca que el PEG sea el agente que cause toxicidad a las células; en el sistema que se propone para la encapsulación y direccionamiento de la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata, el PEG tiene como fin último el servir como vehículo. Sin embargo, al comparar el efecto del PEG solo con aquel en que fueron sintetizadas las nanopartículas de plata, se observaron cambios notables en la toxicidad del sistema, encontrando que la dosis D1 (23.54 μM Ag + 99.68 μM PEG) causó una disminución de la viabilidad celular del 20 %, mientras que las dosis D2, D3 y D4 (117.70 μM Ag + 498.41 μM PEG; 588.60 μM Ag + 2492.06 μM PEG; 2943.40 μM Ag + 12460.30 μM PEG, respectivamente) mostraron 0 % de viabilidad celular. Al comparar la dosis D2 con la dosis C2 se encontró que las nanopartículas de plata tienen un efecto tóxico importante en las células desde las 24 h, efecto que no es atribuible al PEG, sino únicamente a la plata, porque a las 24 h de tratamiento el PEG solo (C2) no indujo disminución de la viabilidad celular, mientras que el PEG con plata (D2) indujo muerte del 100 % de las células, lo que indica que a la dosis efectiva de los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata, en que se elimina al 100 % de las células, el PEG no es tóxico para esta línea celular. Se estudiaron las dosis D1.5 y D1.75 con sus respectivos controles con el fin de tener más datos para la determinación del IC_{50} , encontrando que se requiere un valor de 37.4 μM Ag para inducir toxicidad al 50 % de las células.

En los estudios realizados en la línea celular MCF7 (Figura 7B), se encontró que para las 24 h de tratamiento, el paclitaxel indujo un 25 % de disminución en la viabilidad celular, valor ligeramente mayor que lo encontrado en MDA-MB-231. La evidencia sugiere que las células MCF7 son más sensibles al tratamiento con paclitaxel bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo; partiendo de este

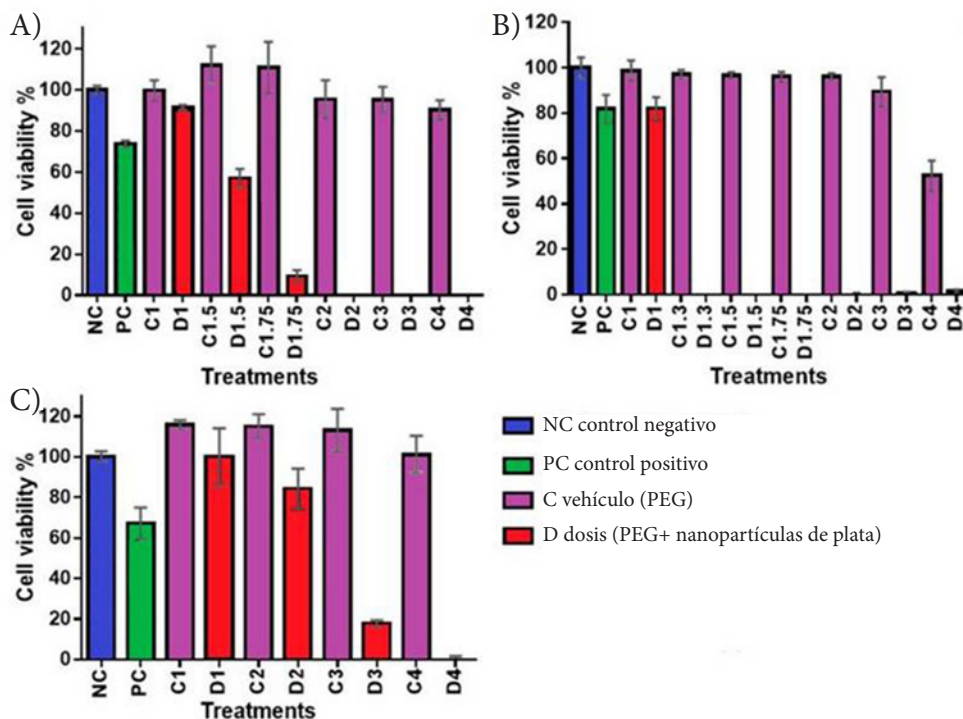


Figura 7. Efecto en la viabilidad celular del PEG y el PEG con nanopartículas de plata en las líneas celulares A) MDA-MB-231, B) MCF7 y D) MCF10A.

dato, se observa que a 24 h, las dosis C1, C2 y C3, (99.68 μM PEG; 498.41 μM PEG y 2492.06 μM PEG, respectivamente) no mostraron diferencia estadística significativa con el control negativo, indicando que no hay un efecto significativo del PEG en la viabilidad celular a esas concentraciones; por su parte, la dosis C4 (12460.30 μM PEG) redujo en un 10 % la viabilidad celular. Por otro lado, la dosis D1 (23.54 μM Ag + 99.68 μM PEG) redujo la viabilidad celular a 95 %; sin embargo, las dosis D2, D3 y D4 (117.70 μM Ag 498.41 μM PEG; 588.60 μM Ag 2492.06 μM PEG; 2943.40 μM Ag + 12460.30 μM PEG, respectivamente) al igual que en las células MDA-MB-231, indujeron una muerte del 100 % de las células, al comparar C2 con D2 a las 24 h (viabilidad del 100 % contra el 0 %), se hace evidente que el efecto del nanotransportador se debe a las nanopartículas de plata y no al PEG; aunque si bien, éste podría aportar toxicidad al sistema, como lo demostró en los ensayos en que se empleó solo, las nanopartículas de plata alcanzan este efecto por sí mismas. Se evaluaron las dosis 1.3, 1.5 y 1.75 para identificar el valor de la IC_{50} , encontrando que se requiere una dosis de 75.74 μM Ag para inducir toxicidad al 50 % de las células; este valor es el doble que la

dosis requerida para obtener el mismo efecto en la línea celular MDA-MB-231, lo que indica que estas últimas son más sensibles a la toxicidad inducida por las nanopartículas de plata.

Los estudios en la línea celular MCF 10A, por su parte, permitieron observar que a 24 h esta línea celular es más sensible al efecto del paclitaxel (véase la Figura 7C), respecto a las dos líneas celulares reportadas anteriormente, con un porcentaje de viabilidad cercano al 70 %. Por su parte, el PEG a las dosis C1-C4, no indujo efectos estadísticamente significativos en la viabilidad de la línea celular. Por su parte, la dosis D1 (23.54 μM Ag + 99.68 μM PEG) del nanotransportador no mostró un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad de esta línea celular, mientras que la dosis D2 (117.70 μM Ag + 498.41 μM PEG) redujo su viabilidad hasta un 80 %; por su parte las dosis D3 y D4 (588.60 μM Ag + 2492.06 μM PEG y 2943.40 μM Ag + 12460.30 μM PEG, respectivamente) indujeron toxicidad en todas las células, mostrando un 0 % de viabilidad; si se compara D3 con C3 es posible notar que no hubo un efecto del PEG en la viabilidad estadísticamente significativo, mientras que el nanotransportador indujo daño en todas las células, por lo que el efecto en la viabilidad se puede atribuir a las nanopartículas de plata. Se determinó la IC_{50} del nanotransportador polimérico de nanopartículas de plata para esta línea celular, encontrando que a una dosis de 362.04 μM Ag, el 50 % de las células presentaron daño a las 24 h de tratamiento, si este valor se compara con las dos líneas celulares reportadas anteriormente encontramos que las células MDA-MB-231 son las más sensibles al tratamiento ($\text{IC}_{50} = 37.4 \mu\text{M}$ Ag), seguida por MCF7 ($\text{IC}_{50} = 75.74 \mu\text{M}$ Ag), mientras que las células MCF 10A mostraron mayor resistencia ($\text{IC}_{50} = 362.044 \mu\text{M}$ Ag), debido a que las dos primeras líneas son derivadas de cáncer y la última no lo es, estos resultados permiten afirmar que el tratamiento, sin evaluar el direccionamiento farmacológico del nanotransportador, presenta por sí mismo una diferencia de toxicidad entre células de cáncer y células normales, observando que en los ensayos realizados en esta investigación la línea MCF 10A requirió de una dosis de 9.6 veces la dosis empleada en MDA-MB-231 para alcanzar el mismo efecto a las 24 h de tratamiento, mientras que la dosis requerida para alcanzar el 50 % de viabilidad en MCF 10A a 24 h de tratamiento fue de 4.78 veces la requerida para alcanzar el mismo efecto en las células MCF 7.

La dosis de paclitaxel efectiva para inducir daño en las tres líneas celulares presenta valores cercanos en magnitud (μM) a los obtenidos mediante el uso de los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata. Como se pudo

observar, los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata han demostrado ser una alternativa para el estudio y desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer de mama, ya que mostraron resultados prometedores.

Por otro lado, se desarrolló un estudio de la toxicidad de la SBA en los tres cultivos celulares; para ello, la lectina fue disuelta en una concentración de 2000 μg SBA/ ml PBS pH 7.2; la solución fue filtrada en esterilidad con filtros de 0.22 μm . A partir del stock se realizaron ensayos en los que se evaluaron diferentes dosis de la SBA en las tres líneas celulares (0.5-2.0 μM), empleando como control negativo células sin tratamiento, como control positivo células tratadas con paclitaxel (0.293 μM) y células tratadas con PBS en el volumen en que se adicionó para dar lugar a las concentraciones de SBA para cada tratamiento, el PBS no causó efectos en la viabilidad celular a las 24 h de tratamiento para ninguna de las cuatro dosis evaluadas. Al comparar estos resultados con los obtenidos para SBA, no se observan cambios estadísticamente significativos, por lo que se concluyó que la SBA no es tóxica para las líneas celulares estudiadas, bajo las condiciones de tratamiento.

3.4 Bioconjugación del nanotransportador con la SBA

Para realizar la conjugación de los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata con la SBA se consideraron los valores de $1/2*IC_{50}$, IC_{50} y $2*IC_{50}$ a 24 h para cada línea celular; para ello, a partir de la corrida 1 con pH ajustado a 9.0 ± 2.0 , se midió el volumen necesario para obtener la dosis de Ag requerida para cada tratamiento. A partir de esta solución se llevó a cabo la conjugación, agregando 218.88 μg SBA a cada experimento, a fin de obtener en los ensayos celulares, una dosis total de 2.0 μM SBA. El pH de conjugación fue de 5.8, ésta se mantuvo durante 8 h a 4 °C. Una vez concluido el tiempo de conjugación las muestras fueron liofilizadas. Se emplearon como controles, muestras sin SBA.

Las micrografías electrónicas de la Figura 8 muestran, por una lado, A) la estructura en nanoesfera del nanotransportador; B) la estructura de la SBA con diámetro aproximado de entre 5 y 8 nm, y C) la conjugación de estos dos en estructuras esféricas con diámetros de entre 100 y 200 nm. El nanotransportador es una nanoesfera con nanopartículas de plata dispuestas al azar en el entramado polimérico; una vez conjugada esta nanopartícula, es posible observar la disposición de la SBA en su superficie, a manera de glóbulos, es probable que no todo el

PEG haya reaccionado en la síntesis de nanopartículas de plata y esta nanopartícula se encuentre rodeada por moléculas de PEG que le confieran estabilidad; sin embargo, para conocer esta información es necesario desarrollar análisis futuros.

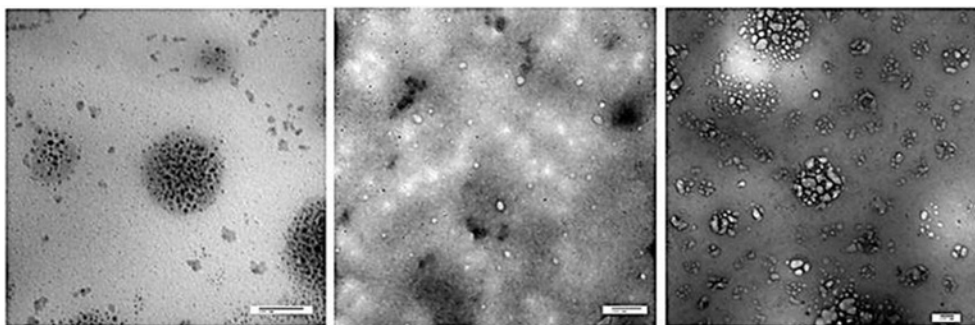


Figura 8. TEM de A) los nanotransportadores de nanopartículas; B) la SBA, y C) los nanotransportadores conjugados con la SBA (valor de la barra=100 nm). Modificada de [19].

Se evaluó la toxicidad del nanotransportador simple y conjugado en la línea celular MDA-MB-231 a 24 h de tratamiento empleando, como controles, células sin tratamiento (control -) y células tratadas con paclitaxel (0.293 μM). Para ello, los nanotransportadores conjugados y no conjugados fueron resuspendidos en medio de cultivo homogeneizados y filtrados en esterilidad con filtros de 0.22 μm . Los resultados de toxicidad fueron revelados mediante el ensayo MTT. La Figura 9A permite observar que con valores de $\frac{1}{2} \cdot \text{IC}_{50}$ el nanotransportador y el conjugado mostraron un efecto tóxico muy bajo, para los estudios realizados con las dosis IC_{50} fue posible observar que el bioconjugado mostró un aumento de la toxicidad del transportador, dando como resultado una viabilidad cercana al 20 %. Por su parte, los nanotransportadores mostraron cambios menores en su toxicidad. Ambos tratamientos causaron la muerte de casi el 100 % de las células cuando se emplearon concentraciones de $2 \cdot \text{IC}_{50}$.

Por otro lado, en la línea celular MCF7 (Figura 9B) se observó que el nanotransportador sin conjugar se favorece su toxicidad con el proceso de síntesis, de manera que se redujo la dosis necesaria para causar daño al 50 % de las células, alcanzándose este efecto con valores de $\frac{1}{2} \cdot \text{IC}_{50}$, resultado similar al encontrado con el bioconjugado.

Al comparar el comportamiento de los 3 tratamientos en ambas líneas celulares, MDA-MB-231 y MCF7, (ver Figura 9C), es posible observar que la síntesis del nanotransportador fuera del medio de cultivo permite obtener valores de

citotoxicidad mayores, comparados con las muestras sintetizadas en el medio de cultivo (denominadas: nanopartículas de plata), disminuyendo el valor de la IC_{50} a 34.69 y 35.70 μM Ag, para las células MDA-MB-231 y MCF7, respectivamente. Mientras que la bioconjugación reduce aún más este valor, alcanzando el mismo efecto con dosis de 24.92 y 31.38 μM Ag para las células MDA-MB-231 y MCF7, respectivamente.

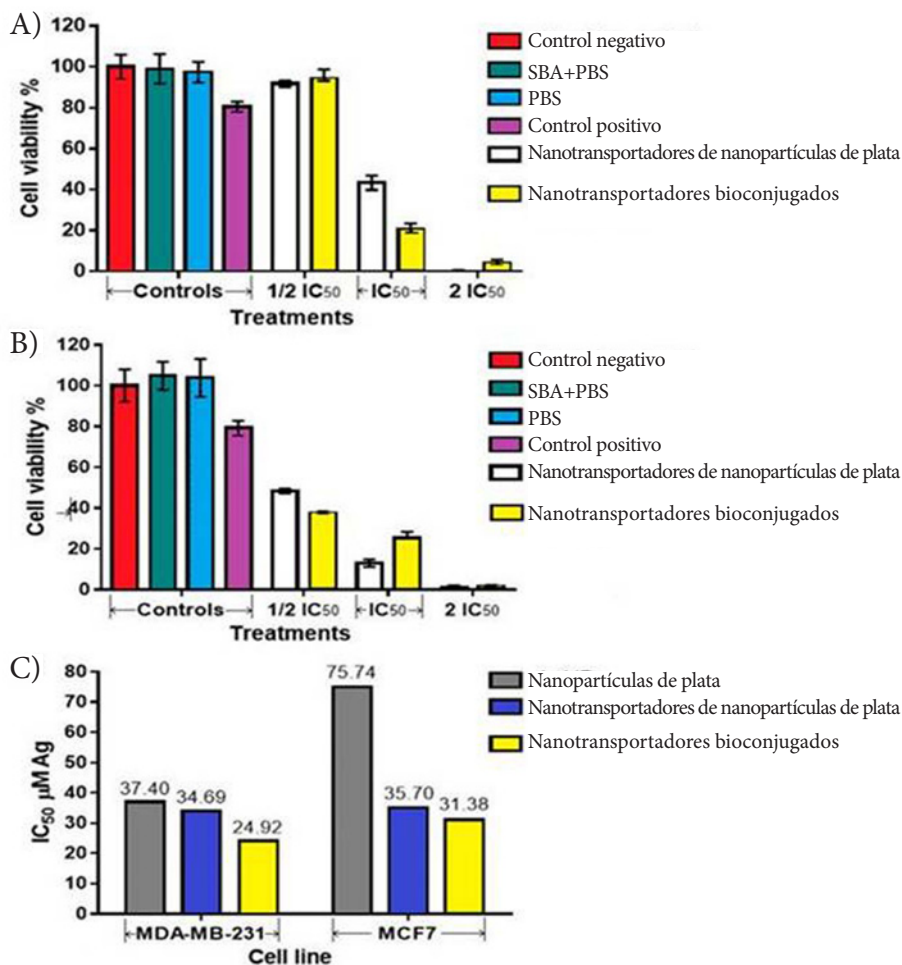


Figura 9. Efecto en la viabilidad celular de A) MDA-MB-231; B) MCF7 inducido por los tratamientos con nanotransportadores de nanopartículas de plata sin conjugar y bioconjugados con la aglutinina de soya (SBA), y C) comparación de los valores de IC_{50} de los tres tratamientos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7.

3.5 Purificación y caracterización de la proteína de soja

Se realizó la cuantificación de proteínas totales de cada etapa del proceso de purificación de la lectina de soja (*Glycine max*) por el Método de Lowry, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Contenido de Proteínas totales por el Método de Lowry, en las diferentes etapas del proceso de purificación.

| Extracto | Contenido de Proteínas [mg/ml] |
|--|--------------------------------|
| Sobrenadante-Extracto salino | 7.37 |
| Sobrenadante, 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5.05 |
| Sobrenadante, 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.09 |
| Pellet disuelto dializado, 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.54 |
| Cromatografía de afinidad | 2.72 |

Se tomaron muestras de cada extracto y se analizaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE (10 %), las cuales se corrieron junto a controles de SBA pura para comparar las bandas de corrida y poder certificar la presencia de aglutinina de soja en las muestras.

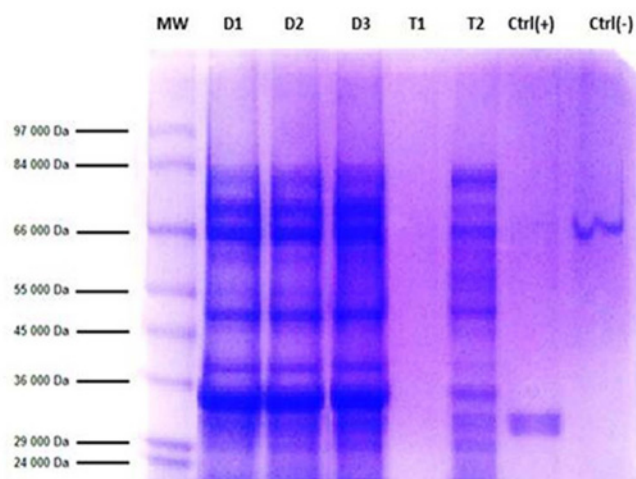


Figura 10. Gel de electroforesis. MW= marcador de peso molecular; D1, D2, D3, D4, D5= muestras de dializados después del salting out; T1, T2= fracciones 7 y 3, respectivamente, de la cromatografía de afinidad; Ctrl(+)= SBA pura (Sigma-Aldrich); Ctrl(-)= Albúmina de Suero Bovino; Da= Daltons.

Ha sido previamente definido que las subunidades de la SBA de *Glycine max* migran a una distancia equivalente a $30,300 \pm 400$ Da [20]. Confirmación que se hace por comparación con el marcador de peso molecular y el control positivo.

El gel de electroforesis nos muestra la separación electroforética de las proteínas presentes en las muestras de los extractos obtenidos durante el proceso de purificación (Figura 10). Los dializados contienen un pool de proteínas con pesos moleculares menores a los 90 kDa, y en cada uno de ellos se puede observar la banda de la SBA, en un tamaño aproximado de 30 kDa. En la muestra T1, que es la fracción 7 de la cromatografía de afinidad, no se puede percibir la presencia de alguna proteína. La muestra T2, fracción 3, evidencia la presencia de la proteína de interés junto con algunas otras proteínas que poseen menor intensidad de las bandas en comparación de los dializados (antes de la cromatografía).

3.6 Bioconjugación

Para desarrollar la bioconjugación por atracción de cargas, se evaluó la influencia del pH sobre el potencial Z de la aglutinina de soya (SBA) y de la proteína purificada parcialmente (T2). Debido a que el bioconjugado se debe trabajar a pH cercanos al fisiológico, se estudió la variación del potencial Z en un rango de pH de 4 a 8. En la Tabla 8 vemos los resultados obtenidos para la aglutinina de soya, en donde el potencial Z se ve afectado proporcionalmente al pH (Figura 11). En la SBA comercial predominan las cargas negativas en todo el rango estudiado. Cabe mencionar que esta proteína fue resuspendida en PBS y, por este motivo, al realizar las mediciones vemos que la conductividad de la muestra es muy alta. Para estudios futuros se sugiere probar otros medios de disolución para la bioconjugación.

Tabla 8. Potencial Z de la Aglutinina de Soya (SBA) disuelta en PBS (pH 7.4) a diferentes condiciones de pH.

| pH | ZP[mV] | Conductividad [mS/cm] |
|-------|--------|-----------------------|
| 4,185 | -1,53 | 18,1 |
| 4,819 | -2,7 | 17,3 |
| 6,124 | -3,04 | 19,3 |
| 7,089 | -3,33 | 21,7 |
| 7,819 | -4,1 | 20,4 |

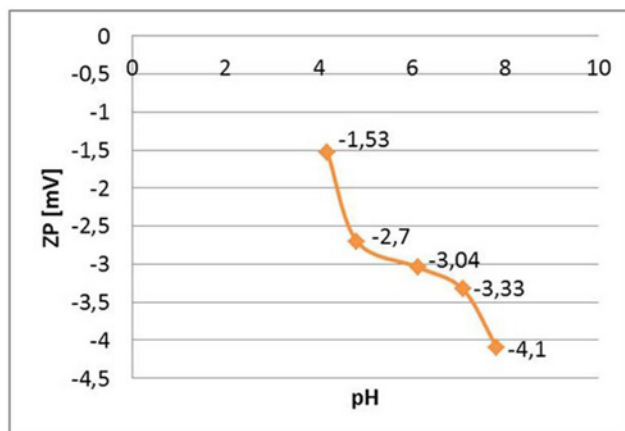


Figura 11. Gráfico del Potencial Z en función del pH, para la para la aglutinina de Soya.

La Tabla 9 muestra los resultados obtenidos para la muestra purificada (T2), en donde el potencial Z se ve afectado proporcionalmente al pH (Figura 12). La SBA purificada parcialmente presenta cargas positivas predominantes cuando el pH es menor, aproximadamente, a 4.5. Las cargas negativas son superiores en cuando tenemos pH mayor a 4.5. Esta muestra fue, también, resuspendida en PBS, y es por esta razón que también posee muy alta conductividad.

Tabla 9. Potencial Z de la muestra purificada (T2) disuelta en PBS (pH 7.4) a diferentes condiciones de pH.

| pH | ZP [mV] | Conductividad [mS/cm] |
|-------|---------|-----------------------|
| 4,063 | 3,03 | 18,6 |
| 4,950 | -5,11 | 19,1 |
| 6,022 | -7,56 | 19,1 |
| 7,088 | -8,76 | 19,2 |
| 8,098 | -9,2 | 19,1 |

Los nanotransportadores estudiados para su almacenamiento, presentan una estabilidad mejorada a pH 9; sin embargo, se cambió este pH al momento de ser funcionalizados debido a que las proteínas tienen cargas positivas predominantes a más bajo pH, para que puedan unirse por atracción de cargas.

Se realizó exitosamente la bioconjugación de las proteínas con el nanotransportador; sin embargo, se debe trabajar más en la purificación de la lectina para disminuir los costos del material a emplear en las pruebas en animales.

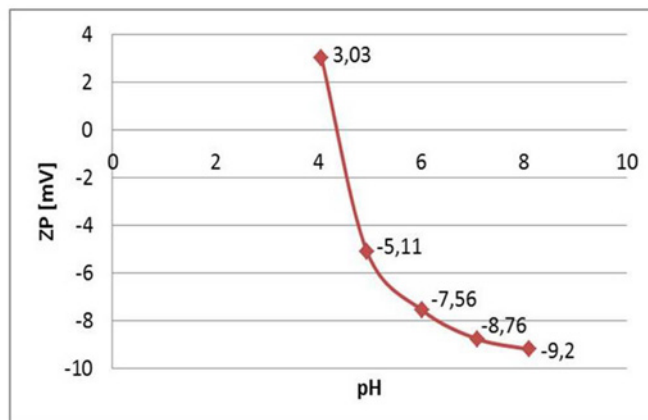


Figura 12. Gráfico del Potencial Z en función del pH, para la muestra T2.

3.7 Descripción macroscópica e histológica del tumor desarrollado en el modelo murino

Después de la inducción de tumor en ratones hembra Balb/c, con la línea celular 4T1 (Figura 13), que de acuerdo con el proveedor corresponde a un modelo de cáncer de mama humano en estadio clínico IV, se realizó el estudio histopatológico (Figura 14). El tumor ubicado en región pélvica anterior, midió 3x3x2 cm., macroscópicamente se observó de color café claro, con áreas de necrosis central, ulcerada en la porción externa y central con costra hemática, fijo a planos profundos. Desde el punto de vista histopatológico corresponde a carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado (70 %), con patrón sólido de tipo sarcomatoide y necrosis en el 50 % del volumen total, el tumor presenta áreas moderadamente diferenciadas (30 %) con formación de escasos ductos, algunos de ellos parecen artificios ya que se organizan alrededor de adipocitos, las células tumorales son de tamaño variable, con citoplasma amplio y núcleos con pleomorfismo, hipercromasia y nucléolos prominentes, se identificaron de 7 a 10 mitosis en 10 campos a seco fuerte (40X), en sus bordes se identificó invasión a la dermis profunda, reticular y papilar, incluso con invasión a la epidermis y ulceración, no se observó invasión a vejiga, ni metástasis a corazón, bazo, hígado, riñones, pero se identificaron numerosos nódulos tumorales metastásicos en pulmones (en parénquima y pleura) y a ganglios linfáticos mediastinales y del hilio pulmonar. La inmunohistoquímica permitió observar que el tejido es negativo a receptor hormonal, negativo a Cerb-B2, positivo a p53 y ki-67, y negativo a CD-34. Todos los anticuerpos con controles positivos, satisfactorios. En conclusión, el tumor expresa epítopes similares a los del Tumor humano de cáncer de mama.



Figura 13. Ratones hembra Balb/c inducidos a cáncer de mama a través de células 4T1, extirpado del tumor para su análisis histopatológico.

4. Conclusiones e impacto de la investigación

Se obtuvieron nanopartículas de plata con diámetro homogéneo de 7.3 ± 3.2 nm por el método del poliol a partir de la reducción de AgNO_3 con PEG de 8000 Da, a 120 min, 70 °C y 0.5 % peso de AgNO_3 .

Los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata mostraron tamaños de partícula cercanos a los 100 nm, en seco, con estructuras de nanoesfera polimérica con nanopartículas de plata embebidas en su interior.

La línea celular MDA-MB-231 mostró ser más sensible al tratamiento con los nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata sintetizados por autoensamble ($\text{IC}_{50} = 37.4 \mu\text{M Ag}$), seguida por MCF7 ($\text{IC}_{50} = 75.74 \mu\text{M Ag}$); mientras que las células MCF 10A mostraron mayor resistencia ($\text{IC}_{50} = 362.044 \mu\text{M Ag}$), debido a que las dos primeras líneas son derivadas de cáncer y la última no lo es. Estos resultados permiten afirmar que el tratamiento, sin evaluar el direccionamiento farmacológico del nanotransportador, presenta por sí mismo una diferencia de toxicidad entre células de cáncer y células normales, observando que en los ensayos realizados en esta investigación la línea MCF 10A requirió de una dosis de 9.6 veces la dosis empleada en MDA-MB-231 para alcanzar el mismo efecto a las 24 h de tratamiento, mientras que la dosis requerida para alcanzar el 50 % de

viabilidad en MCF 10A a 24 h de tratamiento fue de 4.78 veces la requerida para alcanzar el mismo efecto en las células MCF 7.

La bioconjugación del nanotransportador con la SBA se realizó de manera efectiva por 8 h a 4 °C. La bioconjugación del nanotransportador con la SBA permitió reducir los valores de IC_{50} para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7, resultados prometedores para un avance del estudio a sistemas *in vivo*; sin embargo, su efecto real en el direccionamiento farmacológico tendrá que ser evaluado en ensayos futuros en modelos animales que no sólo presentan las barreras naturales que el nanotransportador debe atravesar para ser efectivo, sino que además presentan las condiciones propias de los tumores sólidos que favorecen la capacidad de direccionamiento de la SBA hacia el sitio tumoral.

Se desarrolló exitosamente un modelo murino de cáncer de mama con epítipes similares al cáncer de mama humano, negativo a receptores hormonales y a Her-2-neu, que es la punta de lanza para la investigación *in vivo*.

Los datos que se tienen hasta el momento son prometedores. Más allá de estos buenos resultados obtenidos en este trabajo, queda por comprobar que el sistema presente direccionamiento activo y pasivo en estudios *in vivo*, por lo que queda un gran camino por recorrer en esta investigación; sin embargo, el sistema ha probado ser una herramienta potencial en el tratamiento de este conjunto de neoplasias. Sobre todo mediante el uso de la SBA, que en general mostró inducir mejoras en la toxicidad del nanotransportador *in vitro*, pero cuyo verdadero valor será conocido en estudios animales, en donde el ambiente tumoral es natural y permitirá una mejor acción de la SBA como agente de direccionamiento farmacológico.

El impacto que se tendrá a futuro sobre la reducción de cáncer de mama con la aplicación de la tecnología de nanotransportadores de fármacos funcionalizados, será muy importante para la sociedad mexicana.

Agradecimientos

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, por el apoyo económico obtenido SIP: 20160249 (proyecto multidisciplinario); al CONACyT, por el apoyo económico en los diferentes proyectos financiados para el desarrollo de esta investigación.

Referencias

1. Torre, L., Siegel, R., Ward, E., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(1), 16-27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
2. Chávarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D. & Goss, P (2017). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology*, 13(8), e335-e343. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70246-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70246-2)
3. Bassiouni, Y., & Faddah, L. (2012). Nanocarrier-Based Drugs: The Future Promise for Treatment of Breast Cancer. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(5), 225-232. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2530>
4. Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>
5. Nishiyama, N. & Kataoka, K. (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery". *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3), 630-648. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.006>
6. Sinha, S., & Surolia, A. (2005). Oligomerization Endows Enormous Stability to Soybean Agglutinin: A Comparison of the Stability of Monomer and Tetramer of Soybean Agglutinin. *Biophysical Journal*, 88(6), 4243-4251. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061309>
7. Ohuchi, N., Nose, M., Abe, R., & Kyogoku, M. (1984). Lectin-binding patterns of breast carcinoma: Significance on structural atypism. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 143(4), 491-499. <https://doi.org/10.1620/tjem.143.491>
8. Morecki, S. Shlomo, M., & Shimon, S. (1988). Removal of breast cancer cells by soybean agglutinin in an experimental model for purging human marrow. *Cancer Research*, 48, 4573-4577.
9. AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano*, 3(2), 279-290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
10. Wu, Q., Cao, H. Luan, Q., Zhang, J., Wang, Z., Warner, J., & Watt, A. A. R. (2008). Biomolecule-Assisted Synthesis of Water-Soluble Silver Nanoparticles and Their Bio-medical Applications. *Inorganic Chemistry*, 47(13), 5882-5888. <https://doi.org/10.1021/ic8002228>

11. Carlson, C., Hussain, S., Schrand, A., Braydich-Stolle, L. K. Hess, K., Jones, R., & Schlager, J. (2008). Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), 13608-13619. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>
12. Hsin, Y., Chen, C., Huang, S., Shih, T., Lai, P., & Chueh, P. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 179(3), 130-139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.015>
13. Fang, J., Nakamura, H., & Iyer, A. (2007). Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*, 15(7-8), 475-486. <https://doi.org/10.1080/10611860701498286>
14. Ijaz Hussain, J., Kumar, S., Adil Hashmi, A. & Khan, Z. (2011). Silver Nanoparticles: Preparation, Characterization, And Kinetics. *Advanced Materials Letters*, 2(3), 188-194. <https://doi.org/10.5185/amlett.2011.1206>
15. Luo, C., Zhang, Y., Zeng, X., Zeng, Y. & Wang, Y. (2005). The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288(2), 444-448. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.03.005>
16. Larsson, E., & Mattiasson, B. (1996). Evaluation of affinity precipitation and a traditional affinity Chromatographic procedure for purification of soybean lectin, from extracts of soya flour. *Journal of Biotechnology*, 49(1-3), 189-199. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01543-X](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01543-X)
17. Lowry, O., & Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biomol Chem*, 193(1), 265-275.
18. Vretblad, P. (1976). Purification of lectins by biospecific affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 434(1), 169-176. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90047-7)
19. Casañas Pimentel, R., Robles Botero, V., San Martín Martínez, E., Gómez García, C. & Hinestroza, J. (2016). Soybean agglutinin-conjugated silver nanoparticles nanocarriers in the treatment of breast cancer cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(3), 218-234. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116892>
20. Lotan, R., Siegelman, H., Lis, H., & Sharon, N. (1974). Subunit structure of soybean agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*, 249(4), 1219-1224.