

## Las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano inducen muerte celular independiente de caspasas pero dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno en las líneas celulares tumorales MCF-7 y HeLa.

Carolina Rodríguez-Abrego<sup>a</sup>, Zugeeissy de León-Chávez<sup>a</sup>, Diana Zárate-Triviño<sup>a</sup>, Ana Carolina Martínez-Torres<sup>a\*</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, Nuevo León, México. \*[ana.carolina.mtz@gmail.com](mailto:ana.carolina.mtz@gmail.com).

**Palabras clave:** Nanopartículas de oro, quitosano, MCF-7, HeLa

### Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y letalidad en la población femenina, seguido por el cáncer cervicouterino<sup>1</sup>. En la actualidad, los tratamientos para combatir estos padecimientos no han sido lo suficientemente eficaces para erradicarlos, por esta razón el desarrollo de nuevas alternativas para tratar estas enfermedades es de gran importancia<sup>2</sup>. Entre los tratamientos de nueva generación se encuentran las nanopartículas de oro (Aunp's); éstas han sido propuestas como potenciales agentes antineoplásicos cuya eficacia citotóxica puede ser potenciada mediante el uso de agentes estabilizadores, como el quitosano, que incrementan su biocompatibilidad<sup>3</sup>. El objetivo de este trabajo se centra en la síntesis de Aunp's recubiertas de quitosano, de 10 nm, y en el análisis del efecto citotóxico que éstas inducen en las líneas de cáncer de mama, MCF-7 y cáncer cervicouterino, HeLa.

### Parte experimental

La síntesis de las Aunp's recubiertas de quitosano se realizó mediante el método de Turkevich. Para encontrar el índice de citotoxicidad media inducido por las Aunp's sobre las células MCF-7 y HeLa, se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), a 24, 48 y 72 horas y concentraciones de 0 a 100  $\mu$ M. Para determinar si las Aunp's provocan muerte celular, se realizó un marcaje de las células con anexina V (Ann V, para analizar la exposición de fosfatidilserina) y yoduro de propidio (PI, para comprobar la integridad de la membrana plasmática). Para determinar el rol de caspasas en este tipo de muerte se utilizó un inhibidor de irreversible de éstas, QVD.oPH. Además, se evaluó la actividad de la caspasa 3, la principal caspasa efectora, a 24 horas con el IC<sub>5</sub> obtenido. Por último, para analizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por Aunp's en esas células, se realizó un ensayo utilizando el diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA), el cual en presencia de ROS es desacetilado en DCF, cuya fluorescencia puede ser detectada por citometría de flujo<sup>4</sup>. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado. Como control positivo se utilizó el etopósido, un inductor de apoptosis clásica.

### Resultados y discusión

Los resultados de la medición de tamaño, potencial Z y resonancia del plasmón superficial, indican que se obtuvieron nanopartículas de oro con un tamaño de 2 a 10 nm, con un valor de potencial Z de 100mV, sugiriendo su estabilidad en solución<sup>5</sup>.

Los ensayos de MTT mostraron la reducción de la actividad metabólica, tiempo y concentración dependiente, para ambas líneas celulares siendo la IC<sub>50</sub> en las células HeLa de 50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M para las células MCF-7. Sin embargo, estos resultados no demuestran en realidad si existe muerte celular ya que las células

no solo pierden su capacidad metabólica al morir<sup>6</sup>.

Los análisis de citometría de flujo establecieron que, en efecto, el tratamiento provoca muerte celular (permeabilidad en la membrana plasmática) regulada (con exposición de fosfatidilserina) en ambas líneas celulares, después de ser tratadas con las respectivas IC<sub>50</sub> por 24 horas. Al inhibir la actividad de las caspasas con QVD<sup>7</sup> se observó que la muerte celular inducida por el tratamiento no es dependiente de dicha actividad en ninguna de las dos líneas celulares; además se observó que existe un 30% de células HeLa con caspasa 3 activa, sin embargo, se ha demostrado que dicha actividad no es siempre necesaria para la inducción de la muerte, sino que puede estar involucrada en otros procesos<sup>8</sup>.

Finalmente, múltiples estudios han demostrado que la citotoxicidad inducida por las Aunp's está ligada a la producción de ROS, por lo que se buscó determinar si estas Aunp's también inducen su producción. Efectivamente, los niveles de ROS se incrementaron en un 35% utilizando el IC<sub>50</sub> de ambas líneas celulares, concordando con la literatura que indica que las nanopartículas metálicas, pueden inducir estrés oxidativo en las células<sup>9</sup>.

### Conclusiones

Se lograron sintetizar nanopartículas de oro recubiertas de quitosano de 10 nm, y se determinó que generan citotoxicidad en las células MCF7 y HeLa, induciendo además alteraciones asociadas a muerte celular regulada. El efecto citotóxico que las Aunp's generan es independiente de la actividad de caspasas pero conlleva la generación de especies reactivas de oxígeno, cuya producción es necesaria para la inducción de la muerte celular de células HeLa y MCF-7. Estos resultados contribuyen a tener un conocimiento más preciso del efecto de las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano frente a células tumorales.

### Agradecimientos

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto. A PAICYT por el apoyo 2015-2016 otorgado a AC-MT y a CONACyT por el apoyo Ciencia Básica otorgado a CR-P.

### Referencias

1. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (consultado (visitado) el 15 de septiembre de 2015).
2. Instituto Nacional del Cáncer (NIH). <http://www.cancer.gov/> (consultado (visitado) el 15 de Septiembre de 2015).
3. Lárez- Velásquez, C. *Avances en Química*, 2006. 1(2), 15-21.
4. Eruslanov, E., Kusmartsev, S. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. 2010. 57-72.
5. Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; & Mattoussi, H. *Langmuir*, 2010. 26(10), 7604-7613.
6. Park, Y. S.; Hong, Y. N.; Weyers, A.; Kim, Y. S., & Linhardt, R. J. *Nanobiotechnology, IET*, 2011. 5(3), 69-78.
7. Caserta, TM. *Apoptosis*. 2003. 8(4). 345-352.
8. McIlwain, D.; Berger, T.; Mark, T.W.; *CSH perspectives*. 2013. 5(4), a008656.
9. Butterworth, K.; McMahan, S.J.; Currell, F.; Prise, K.M. *Nanoscale*. 2012. 4(16), 4830-4838.