

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Pablo Cristobal-Cueto¹, Lorenzo Rivas-García¹, Santiago Gómez², José Manuel Méndez Ariaga², Eva María Galán Moya^{1,3,4}

¹Laboratorio de Oncología Traslacional, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Campus de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, 02008 Albacete, España, pablocristobal09@icloud.com

²Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos, c/Tulipán s/n 28933, Móstoles, Madrid, España.

³Laboratorio de Oncología Traslacional, Hospital Universitario de Albacete, C/Francisco Javier de Moya, 02008, Albacete, España.

⁴Facultad de enfermería, Campus de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España

Resumen: Las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNs) suponen una novedosa plataforma de sistemas de “drug delivery”, disminuyendo la citotoxicidad del fármaco y pudiendo ser funcionalizadas para un aumento de su efectividad. Actualmente se está investigando su actividad en numerosas enfermedades, entre las que destaca el cáncer. El cáncer, como conjunto de enfermedades, es la principal neoplasia maligna en mujeres y la segunda a nivel mundial, habiéndose diagnosticado en 2020 más de 2,2 millones de nuevos casos. De éstos, el 15% pertenecen al subtipo triple negativo (TNBC), definido por la ausencia de receptores tanto hormonales como del factor de crecimiento epidérmico HER2, lo que dificulta el desarrollo de tratamientos. En este trabajo se ha confirmado el efecto antitumoral de las MSNs cargadas con un fármaco proapoptótico frente al TNBC mediante técnicas de viabilidad celular y ensayos de apoptosis confirmándose el mecanismo de acción.

Palabras clave: nanomedicina, liberación controlada, cáncer de mama triple negativo, apoptosis.

1. INTRODUCCIÓN

La nanomedicina es una de las áreas de la nanotecnología (rama de la ciencia encargada del estudio de materiales cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm) basada en la aplicación de nanomateriales en biomedicina. Los nanomateriales poseen unas características físico-químicas únicas que mejoran los parámetros farmacocinéticos de los tratamientos convencionales. Actualmente hay diversas aproximaciones para el uso de nanomateriales en investigación biomédica y es su uso como sistemas de “drug delivery”, una de las aplicaciones con mayor potencial [1]. Por tanto, el desarrollo de nanosistemas permite mejorar la absorción y distribución de fármacos para el tratamiento de infecciones bacterianas o incluso el tratamiento de determinados tipos de cáncer mediante la dosificación de fármacos antitumorales [2,3]. En el ámbito de los nanomateriales existe una gran variedad de tipos que se pueden clasificar atendiendo a su estructura química en nanomateriales orgánicos e inorgánicos [4]. Las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNs) [5] son un tipo de nanomateriales inorgánicos que suponen una novedosa herramienta para el transporte de fármacos por su gran variedad de tamaños y porosidad, la capacidad que tienen para disminuir los efectos citotóxicos de los fármacos portados y su gran capacidad de carga por la elevada relación superficie-volumen, lo que ha hecho que

cada vez más investigadores pretendan utilizar estas nanopartículas para una gran variedad de tratamientos frente a numerosas enfermedades, destacando su presencia en tratamientos antitumorales [6].

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la multiplicación descontrolada de ciertas células anormales del organismo, sobrepasando los límites habituales de proliferación e invadiendo partes adyacentes del organismo. Es la segunda causa de mortalidad en la Unión Europea [7] y, en 2020, se produjeron aproximadamente 10 millones de muertes por cáncer, y se diagnosticaron más de 19 millones de nuevos casos en todo el mundo. El cáncer de mama fue en 2020 el tipo de cáncer con mayor número de casos.

El cáncer de mama se caracteriza por una gran heterogeneidad intratumoral y actualmente esta clínicamente dividido en: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y cáncer de mama triple negativo (TNBC). El subtipo TNBC, tratado en este estudio, se caracteriza por la ausencia de receptores, lo que hace que no tenga actualmente un tratamiento dirigido [8]. Las células del TNBC suelen portar mutaciones en los genes BRCA encargados de llevar a cabo la reparación de roturas dobles de ADN mediante recombinación homóloga, lo que hace que sean susceptibles a tratamientos dirigidos a este sistema de reparación [10,11]. La proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), es la encargada de llevar a cabo la reparación celular en estas células

mutadas, por lo que su inhibición desencadena la partida de la viabilidad celular [11].

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosos compuestos para tratar el TNBC. Algunas de estas drogas han mostrado actividad clínica en otros tumores, como es el caso de los miméticos de BH3, dirigidos contra la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl2 [12]. En la actualidad también hay fármacos inhibidores de PARP aprobados para su uso como monoterapias en el TNBC con mutación en BRCA, testados en ensayos clínicos de fase III [13,14]. Estos fármacos mejoran el pronóstico del 50% de los pacientes con TNBC mutados en BRCA, pero también se ha dado el caso de resistencias [15], y tienen asociados múltiples efectos secundarios.

En esta línea, se desarrollan nuevas formas de liberación de los fármacos antitumorales para que puedan mejorar su eficacia minimizando los efectos secundarios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice

La síntesis de las nanopartículas mesoporosas de sílice fue realizada de acuerdo al procedimiento descrito previamente por Díaz-García y colaboradores [6].

2.2. Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los nanomateriales se caracterizaron mediante TEM de tal modo que se pueda obtener tanto la morfología como el tamaño de las nanopartículas. Esta técnica permite el estudio de materiales de escala nanométrica como es el caso de las MSNs, proporcionando información tanto química como estructural de las mismas, información no accesible mediante microscopía óptica.

2.3. Líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231 (MDA) fue proporcionada por ATCC. Las células se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido en glucosa suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos: penicilina-estreptomina (1%) y ciprofloxacino (1%). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. El medio fue cambiado y las células fueron tripsinizadas cada 3-4 días.

2.4. Ensayo de Viabilidad Celular

Para realizar este ensayo se sembró la línea celular MDA-MB-231 en una placa de 48 pocillos mediante el pipeteo de 7.500 células en un volumen de 200 µL de DMEM, incubándose la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, se trató cada pocillo con 200 µL de soluciones crecientes de nanopartículas mediante dilución seriada (200 - 12,5 µM) y se dejó incubar durante 72 horas. Este tratamiento se llevó a cabo paralelamente con un tratamiento con el fármaco que portaban las nanopartículas. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadieron 200 µL de una solución de MTT (0.5 mg/mL en DMEM sin rojo fenol) incubando la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 40 minutos. Finalmente, se

retiró la solución de MTT y se añadieron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), midiéndose la absorbancia a 555 nm y a 690 nm, ($Abs = Abs_{555} - Abs_{690}$). El procedimiento se realizó por triplicado.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión

La caracterización por TEM muestra una morfología parcialmente esférica con una distribución hexagonal y ordenada de los poros. En la Figura 1. se muestra la morfología característica de este tipo de nanopartículas, así como la estructura interna que presentan en forma de canales hexagonales paralelos que recorren toda la nanopartícula. Estas nanopartículas presentan tamaños más bien homogéneos que no superan los 200 nm de longitud.

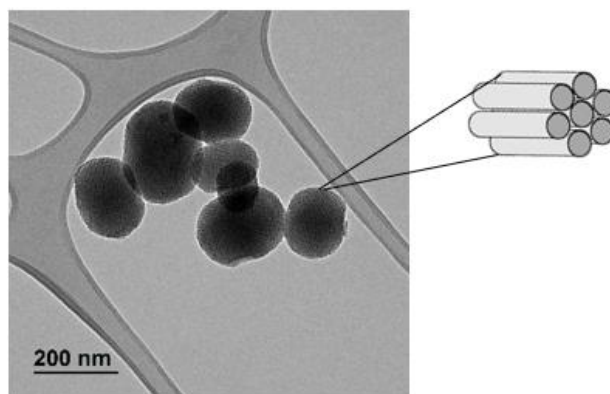


Figura 1. Imagen TEM de las nanopartículas de sílice mesoporosas con el fármaco incorporado.

3.2. Ensayos Biológicos

Tras la caracterización de las nanopartículas se procedió a evaluar la actividad biológica que tenían éstas, en comparación al tratamiento con el fármaco que portaban. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad celular con los que determinar la cantidad mínima necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad celular de las células tumorales MDA-MB-321 del subtipo TNBC. Los resultados se reflejan en la Figura 2. apreciándose una actividad antitumoral de las MSNs incluso a la concentración más baja evaluada (12.5 µM), esta actividad es dosis-creciente.

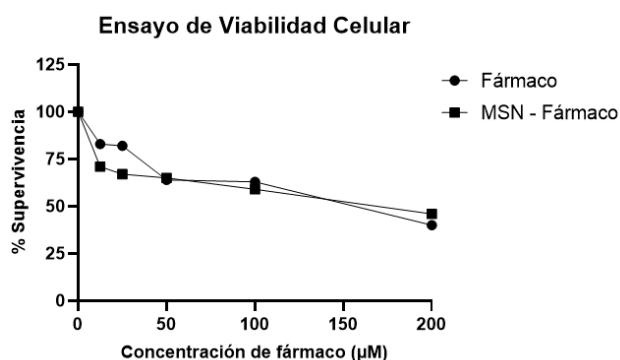


Figura 2. Ensayo de viabilidad celular para las células tumorales MDA-MB-231 con nanopartículas de sílice que portan un fármaco antitumoral (MSN - Fármaco) y el fármaco convencional.

Posteriormente, se determinó el valor de IC_{50} para ambos tratamientos (Tabla 1). A las condiciones del ensayo, el tratamiento con el fármaco mostró un valor de IC_{50} de 127.3 μM , mientras que, para el tratamiento con las nanopartículas, este valor se redujo hasta la concentración de 112.4 μM .

Tabla 1. Concentraciones para reducir de la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 en un 50%.

Tratamiento	IC_{50} (μM)
Fármaco	127.3
MSN-Fármaco	112.4

4. DISCUSIÓN

En este estudio se sintetizaron nanopartículas mesoporosas de sílice a las que se les incorporó un 10% en masa de un fármaco, se caracterizó su forma por la técnica de TEM, y se evaluó su actividad antitumoral frente a la línea celular tumoral de TNBC MBA-MD-231, comparando la actividad de la MSNs frente a la actividad del tratamiento con el fármaco convencional.

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular (Figura 2) demuestran la elevada actividad antitumoral de las MSNs portadoras del fármaco antitumoral, siendo reportado por primera vez la actividad de este nanosistema. En la Figura 2 se observa ya una disminución de la viabilidad celular a concentraciones muy bajas que va creciendo con la dosis tanto para las nanopartículas como para el tratamiento sólo con el fármaco. Con estos resultados se calcularon los IC_{50} para ambos tratamientos, las nanopartículas mostraron un menor IC_{50} que el tratamiento convencional, consiguiendo así disminuir la concentración necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% de 127.3 μM a 112.4 μM , lo que derivaría en una posible mejora del tratamiento mediante la vehiculización del fármaco en las MSNs. Esta actividad del fármaco frente a líneas celulares de cáncer de mama

ha sido reportado previamente, así Pierce *et al.* [16] demostraron la elevada actividad de este inhibidor de PARP frente a 14 líneas celulares de cáncer de mama, tanto del subtipo TNBC como de los demás subtipos, lo que indica que este tipo de tratamiento puede usarse como terapia dirigida para el TNBC.

La alternativa de nanomedicina en el tratamiento del cáncer está experimentando un gran desarrollo en los últimos años. Así, algunos autores ya han reportado resultados esperanzadores empleando nanopartículas lipídicas como “carrier” de numerosos fármacos, aumentando su eficacia en el tratamiento del cáncer de mama [17]. Asimismo, las nanopartículas de sílice se están estudiando como sistema de administración de fármacos para el tratamiento de numerosos tipos de cáncer como el cáncer de pulmón [18], el retinoblastoma [19], o el cáncer de mama entre otros.

Los presentes resultados, demuestran el gran potencial que tienen estos sistemas de “drug delivery” en el desarrollo de terapias dirigidas para numerosos tipos de cáncer, al tener la capacidad de mantener o incluso incrementar la actividad biológica de los fármacos que transportan. Esto hace de la nanotecnología una interesante estrategia para encapsular y dirigir fármacos, pudiendo crear así terapias dirigidas para diferentes tipos de cáncer que actualmente no tengan una terapia establecida, como podría ser el caso del TNBC.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Conde, F. Tian, J. M. de la Fuente, y P. V. Baptista, «Editorial: Cancer Nanotheranostics: What Have We Learned So Far?», *Front. Chem.*, vol. 3, ene. 2016, doi: 10.3389/fchem.2015.00071.
- [2] D. Díaz-García *et al.*, «Copper-functionalized nanostructured silica-based systems: Study of the antimicrobial applications and ROS generation against gram positive and gram negative bacteria», *J. Inorg. Biochem.*, vol. 203, p. 110912, feb. 2020, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110912.
- [3] M. Jurczyk, J. Kasperczyk, D. Wrześniok, A. Beberok, y K. Jelonek, «Nanoparticles Loaded with Docetaxel and Resveratrol as an Advanced Tool for Cancer Therapy», *Biomedicines*, vol. 10, n.º 5, p. 1187, may 2022, doi: 10.3390/biomedicines10051187.
- [4] C. Roma-Rodrigues, L. Rivas-García, P. V. Baptista, y A. R. Fernandes, «Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano?», *Pharmaceutics*, vol. 12, n.º 3, p. 233, mar. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12030233.
- [5] A.-G. Niculescu y A. M. Grumezescu, «Novel Tumor-Targeting Nanoparticles for Cancer Treatment—A Review», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 9, Art. n.º 9, ene. 2022, doi: 10.3390/ijms23095253.
- [6] D. Díaz-García, E. Fischer-Fodor, C. I. Vlad, J. M. Méndez-Arriaga, S. Prashar, y S. Gómez-Ruiz, «Study of cancer cell cytotoxicity, internalization and modulation of growth factors induced by transferrin-conjugated formulations of

- metallodrug-functionalized mesoporous silica nanoparticles», *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 323, p. 111238, ago. 2021, doi: 10.1016/j.micromeso.2021.111238.
- [7] «Cancer». <https://www.who.int/health-topics/cancer> (accedido 27 de mayo de 2022).
- [8] S. Loibl, P. Poortmans, M. Morrow, C. Denkert, y G. Curigliano, «Breast cancer», *The Lancet*, vol. 397, n.º 10286, pp. 1750-1769, may 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(20)32381-3.
- [9] B. N. Peshkin, M. L. Alabek, y C. Isaacs, «BRCA1/2 MUTATIONS AND TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCERS», *Breast Dis.*, vol. 32, n.º 0, p. 10.3233/BD-2010-0306, 2010, doi: 10.3233/BD-2010-0306.
- [10] C. Denkert, C. Liedtke, A. Tutt, y G. von Minckwitz, «Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 389, n.º 10087, pp. 2430-2442, jun. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32454-0.
- [11] M. Javle y N. J. Curtin, «The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation», *Br. J. Cancer*, vol. 105, n.º 8, pp. 1114-1122, oct. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.382.
- [12] S. Cory, A. W. Roberts, P. M. Colman, y J. M. Adams, «Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells», *Trends Cancer*, vol. 2, n.º 8, pp. 443-460, ago. 2016, doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.001.
- [13] M. E. Robson *et al.*, «OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer», *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 30, n.º 4, pp. 558-566, abr. 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz012.
- [14] J. K. Litton *et al.*, «Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation», *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, n.º 8, pp. 753-763, ago. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1802905.
- [15] Y. Han, X. Yu, S. Li, Y. Tian, y C. Liu, «New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer», *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 578095, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.578095.
- [16] A. Pierce *et al.*, «Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines», *Cancer Biol. Ther.*, vol. 14, n.º 6, pp. 537-545, jun. 2013, doi: 10.4161/cbt.24349.
- [17] J. M. Caster *et al.*, «Nanoparticle delivery of chemosensitizers improve chemotherapy efficacy without incurring additional toxicity», *Nanoscale*, vol. 7, n.º 6, pp. 2805-2811, 2015, doi: 10.1039/C4NR07102F.
- [18] Y. Song *et al.*, «Folic acid (FA)-conjugated mesoporous silica nanoparticles combined with MRP-1 siRNA improves the suppressive effects of myricetin on non-small cell lung cancer (NSCLC)», *Biomed. Pharmacother.*, vol. 125, p. 109561, may 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109561.
- [19] W. Qu, B. Meng, Y. Yu, y S. Wang, «EpCAM antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticles to enhance the anticancer efficacy of carboplatin in retinoblastoma», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 646-651, jul. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.036.