

# NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON ÁCIDO FÓLICO Y SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS CANCEROSAS

Rangel Mendoza, Alejandra (1), Cardoso Ávila, Pablo (2), Flores Villavicencio, Lérica Liss (3),  
Sabanero López, Myrna (3), Pichardo Molina, Juan Luis (2)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico:  
ale\_21no@hotmail.com

2 Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. León, Gto. | Dirección de correo electrónico: jpichardo@cio.mx

3 Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: myrna.sabanero@gmail.com

## Resumen

En México, el cáncer cervicouterino es la neoplasia que ocupa el segundo lugar en frecuencia y mortalidad en mujeres de 25 a 49 años. La nanotecnología es considerada una de las tecnologías clave del siglo XXI. Además del uso de nanomateriales en productos cotidianos, numerosas aplicaciones son reportadas en el campo biomédico. Las nanopartículas de oro acopladas con ácido fólico (NPsAu-AF), han sido usadas como marcadores celulares. Actualmente, se llevan a cabo estudios sobre su posible uso en terapia fototérmica. Este estudio, tiene como objetivo determinar la interacción de NPsAu-AF con células de cáncer cervicouterino (HeLa). Los resultados indican una actividad metabólica del 100% y la integridad del citoesqueleto y el núcleo, ya que se observó la característica morfología celular de los microfilamentos de actina (faloidina-FITC) y la distribución de la cromatina en el núcleo (DAPI). El patrón de proteínas no mostró una alteración y la detección de la Hsp 70, indicó que las células no presentaron estrés celular. Los resultados, indican que la exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF no induce un efecto citotóxico. En la actualidad, se realiza la localización por microscopía electrónica de transmisión de las NPsAu-AF en las células cancerosas, así como RT-PCR-Hsp 70.

## Abstract

In Mexico, cervical cancer is the neoplasm ranks second in frequency and mortality in women aged 25 to 49 years 1. Nanotechnology is considered one of the key technologies of the XXI century. Besides the use of nanomaterials in everyday products, many applications are reported in the biomedical field. The gold nanoparticles coupled with folic acid (NPsAu-AF), have been used as cell markers. Currently, studies are carried out on its possible use in photothermal therapy. This study aims to determine the interaction of NPsAu-AF with cervical cancer cells (HeLa). The results indicate a metabolic activity of 100% and the integrity of the cytoskeleton and the nucleus, and that cell morphology characteristic of actin microfilaments (phalloidin-FITC) and distribution of chromatin in the nucleus (DAPI) was observed. The protein pattern showed no alteration and detection of Hsp 70, indicated that the cells did not show cellular stress. The results indicate that exposure of HeLa cells to NPsAu-AF does not induce a cytotoxic effect. Currently, the location by transmission electron microscopy of NPsAu-AF in cancer cells is performed and RT-PCR-HSP70.

### Palabras Clave

Nanotecnología; Estrés celular; Ácido fólico; Neoplasia; Terapia fototérmica

## INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer cervicouterino es la neoplasia que ocupa el segundo lugar en frecuencia y en mortalidad en mujeres de 25 a 49 años. El tratamiento con radioterapia y braquiterapia, brindan un importante beneficio en etapas tempranas del cáncer cervicouterino; sin embargo, en etapa III, la tasa de supervivencia con este tratamiento a cinco años se reduce del 15 al 48% [1, 2].

Se estima que el cáncer cervicouterino, causa alrededor de 500.000 muertes al año en el mundo. La incidencia, muestra una tendencia al aumento en los años recientes entre mujeres menores de 50 años en USA y Europa, reflejado por un aumento en la detección por el uso de nuevas técnicas diagnósticas, tales como la prueba de HPV y cervicografía. El tratamiento depende primariamente de la extensión de la lesión, y también de factores como la edad, el deseo de conservar la fertilidad y presencia de otras condiciones médicas [3].

La nanotecnología es considerada como una de las tecnologías clave del siglo XXI. Además del uso de los nanomateriales en productos de consumo, numerosas aplicaciones son reportadas en el campo biomédico. Los nanomateriales para la formación de imágenes y administración de fármacos a menudo se recubren con biomoléculas como ADN, proteínas y anticuerpos monoclonales. [4].

Las modalidades convencionales del tratamiento del cáncer tienen varias limitaciones, incluyendo la falta de eficacia, toxicidad adversa grave, así como la resistencia a los medicamentos. En la actualidad, el descubrimiento de moléculas blanco sobreexpresadas en las células cancerígenas, las cuales participan en las vías moleculares cruciales para el crecimiento tumoral, el mantenimiento y la metástasis. Estas moléculas blanco, son utilizadas

para el diseño de un tratamiento específico, por ejemplo: el receptor de folato que es sobreexpresado en la superficie de células de tumores como ovario, riñón, pulmón, cerebro, endometrial, colorectal, de páncreas, gástrico, próstata, testicular, vejiga, cabeza y cuello [5]. En este sentido, la conjugación de ácido fólico con nanopartículas (NPAu-AF), es un enfoque novedoso para el tratamiento específico de los tejidos que sobreexpresan el receptor a folato [6]. Por lo que en este estudio, el objetivo fue determinar la interacción de nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico y su interacción con células de cáncer cérvico uterino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Como células huésped, se utilizó las líneas celulares HeLa (ATCC® CCL2™). Las células se crecieron en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco), con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 h.

### Nanopartículas de oro acopladas a ácido fólico.

Las nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico fueron sintetizadas por el Dr. Juan Luis Pichardo Molina y Dr. Pablo Cardoso Ávila (Centro de Investigaciones en Óptica A.C.). Se utilizaron dos tipos de NPsAu-AF; 1) NPsAu-Cys-BSA-AF: nanopartículas de oro-cisteamina-albumina sérica bovina-ácido fólico, 2) NPsAu-4ATP-BSA-AF: nanopartículas de oro-4-aminotiofenol-albumina sérica bovina-ácido fólico

## Interacción de las NPsAu-AF con las células huésped

Las células huésped fueron expuestas a diferentes concentraciones de las NPsAu-AF por 24h a 37°C/5% CO<sub>2</sub>; para la determinación de la curva dosis-respuesta y el análisis de citotoxicidad. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

### Determinación de la actividad metabólica

Se realizó por el método de XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide), basándose en la reducción de la sal a cristales de formazan solubles en agua, proceso llevado a cabo por las mitocondrias de las células viables. La solución de XTT se preparó con 0.25mg/mL en Menadiona al 0.1mM. Se añadió a las muestras celulares tratadas con las NPsAu-AF y se incubó por 90min a 37°C en oscuridad y se midió la absorbencia a 490nm.

### Análisis del patrón electroforético y determinación de la Hsp70

Se realizó un homogenado total de las células con/sin exposición a las NPsAu-AF y se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (10%), la visualización de las proteínas se obtuvo después de la tinción con azul de Coomassie. Por otra parte, se realizó una inmunotransferencia y se inmunodetectó la proteína Hsp70, utilizando un anticuerpo contra la Hsp70 (Santa Cruz) y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (sigma), después se reveló por quimioluminiscencia (kit de quimioluminiscencia BIORAD). Las imágenes fueron obtenidas usando un equipo de adquisición de imagen (ChemiDoc MP System- BIORAD) utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La exposición de las células HeLa a las diferentes concentraciones de las NPsAu-AF, no afectó la actividad metabólica independientemente de la concentración (IMAGEN 1).



IMAGEN 1: Determinación de la actividad metabólica de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF. Control: Células HeLa no expuestas a NPAu-AF. Control negativo: células HeLa que fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (estrés oxidativo) por 30min.

Al analizar dos organelos importantes en la función celular, se observó que no hubo alteración en la estructura del citoesqueleto y núcleo. Las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF no muestran alteraciones en los microfilamentos de actina (imagen 2b y c) comparado con el control (imagen 2a). En el núcleo la sonda fluorescente (DAPI) muestra que no existe una fragmentación nuclear (imagen 2b' y c').

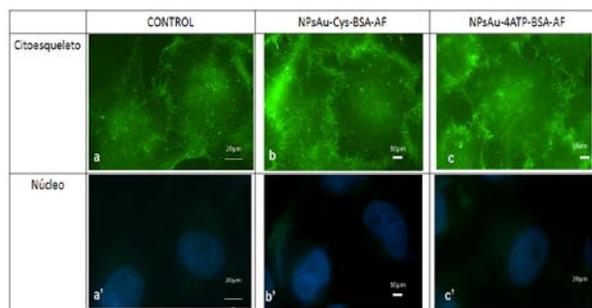


IMAGEN 2: Citoesqueleto y núcleo de células HeLa expuestas a NPAu-AF. Control: Células HeLa no expuestas a NPAu-AF.

El análisis del perfil de proteínas indica que no existe una alteración en el patrón de proteínas totales (IMAGEN 3).

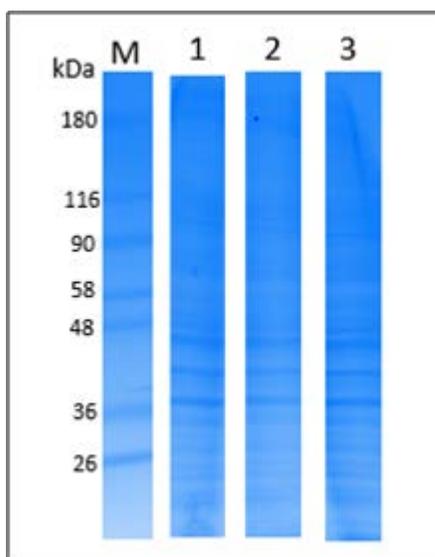


IMAGEN 3: Perfil del patrón de proteínas de células HeLa expuestas a NPsAu-AF. M. Marcadores de peso molecular, 1. Control. Células no expuestas a NPsAu-AF, 2. NPsAu-Cys-BSA-AF, 3. NPsAu-4ATP-BSA-AF.

La detección de la Hsp70 (fig.4), proteína involucrada en procesos de estrés celular, reveló que no existe un estrés en las células expuestas a las NPsAu-AF (fig. 4 carril 2 y 3), comparado con las células HeLa que fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (estrés oxidativo) por 30min (fig.4 carril 4).

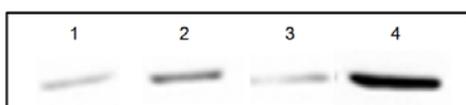


IMAGEN 4: Inmunodetección de la Hsp 70 de células HeLa expuestas a NPsAu-AF. Marcadores de peso molecular, 1. Control. Células no expuestas a NPsAu-AF, 2. NPsAu-Cys-BSA-AF, 3. NPsAu-4ATP-BSA-AF, 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%

## CONCLUSIONES

Los resultados bioquímicos y morfológicos indican que la exposición de las células HeLa a las nanopartículas de oro acopladas a ácido fólico no inducen un efecto citotóxico. En la actualidad, se realiza la localización por microscopia electrónica de transmisión de las NPsAu-AF en las células cancerosas, así como RT-PCR-Hsp 70.

## AGRADECIMIENTOS

Universidad de Guanajuato, proyecto CIO-UG 004/2015 apoyado a MSL y JLPM.

## REFERENCIAS

- [1] de la Garza Salazar, J. G., Ramírez Gaytán, J. L., Solorza Luna, G., Juárez Vergara, P., Aguilar Ponce, J. L. & Mota, A. (2000) Cáncer Cérvico-Uterino. *Gac Méd* 136 (3): 65-68.
- [2] Franco, E. L, Franco, E. D. & Ferenczy, A. (2001) Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 164 (7): 1017-1025.
- [3] Serman, F. (2002) Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. *Perspectivas en prevención y tratamiento. Rev. Chilena de Obst. Ginec.*67 (4): 318-323.
- [4] Arora, S., Rajwade, J. M. & Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258: 151-165.
- [5] Assaraf, Y. G., Leamon, C. P. & Reddy J. A. (2014). The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resistance Updates*. 17: 89-95.
- [6] Ngernyuan, N., Seubwai, W., Daduang, S., Boonsiri, P., Limpai boon, T. & Daduang, J. (2015) Targeted delivery of 5-fluorouracil to cholangiocarcinoma cells using folic acid as a targeting agent. *Materials Science and Engineering C* 60: 411-415.