

EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL USO DE NANOESTRUCTURAS PARA MEJORAR EL TRANSPORTE Y LA INCORPORACIÓN CELULAR DE COMPUESTOS DE PLATINO.

María Montes Bayón, Lucía Gutierrez Romero, Daniel Turiel Fernández, Elisa Blanco González  
 Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo.  
 C/Julian Clavería 8, 33006. Oviedo

Introducción

Aunque es cierto que el cisplatino es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de numerosos tipos de cánceres, entre los que se encuentran los de pecho, ovario, testículo o pulmones, entre otros, los mecanismos de resistencia que aparecen como consecuencia del tratamiento, así como sus efectos secundarios (p.e. nefrotoxicidad y ototoxicidad) hacen necesaria la mejora de la quimioterapia con cisplatino para aumentar su efectividad y su especificidad (1). En este sentido, parece que una de las posibilidades vendría asociada al empleo de nanotransportadores, es decir, estructuras nanométricas que transporten el fármaco de forma más efectiva y específica al tumor (2). En ciertas ocasiones se emplean estos nanotransportadores para transportar el cisplatino junto con otro fármaco, de modo que por efecto sinérgico se potencie el efecto antitumoral. Estas nanoestructuras se acumulan en los tumores o bien haciendo uso del efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR del inglés “enhanced permeability and retention”) o bien de una administración controlada y específica empleando ligandos o anticuerpos unidos al nanotransportador, de manera que se pueda distinguir entre el tejido sano y el tumoral. Una ventaja adicional de los nanotransportadores es que, permiten en muchas ocasiones una liberación controlada del fármaco (3).

De entre los nanotransportadores más empleados para el transporte de cisplatino destacan, por un lado, aquellos que encapsulan o atrapan el fármaco en su interior como los liposomas. Los liposomas son estructuras esféricas creadas de forma artificial empleando colesterol o fosfolípidos, con la característica de no ser tóxicos. Estas estructuras presentan grandes ventajas a la hora de ser usadas como nanotransportadores ya que son capaces de mejorar la eficacia del cisplatino y por lo tanto su efecto terapéutico. El hecho de poder encapsular el cisplatino en su interior aumenta su estabilidad, mejora su biocompatibilidad, reduce los efectos tóxicos explicados anteriormente y permite una unión específica al tumor si se emplean ligandos en la superficie del liposoma. En nuestro grupo de investigación se ha investigado la posibilidad de encapsular el cisplatino en estructuras proteicas en lugar de fosfolípidos o empleando nanopartículas metálicas como soporte del pro-fármaco que luego se liberará en el citosol celular. En las siguientes secciones se resumirán los resultados obtenidos en cada una de estas investigaciones.

A) La ferritina humana como sistema de encapsulación de cisplatino.

La ferritina es una proteína que se encuentra de forma natural en nuestro organismo cumpliendo la función de almacén de hierro y de detoxificación del mismo. Se trata de una proteína formada por 24 subunidades. Estas subunidades se pueden dividir en dos clases, las de tipo H o de tipo L, siendo éstas diferentes entre sí en su peso (pues las H son más pesadas que las de tipo L) y en su función (mientras las subunidades H tienen una función de oxidación frente al hierro, las subunidades L hacen posible la acumulación del hierro en el interior de la proteína). Las 24 subunidades se agrupan entre sí generando una estructura esférica de unos 12 nm con una cavidad interna de 8 nm, en donde el hierro se almacena de forma natural en forma nanoparticulada, concretamente en forma de ferrihidrita (complejo de oxi-hidroxi-fosfato férrico), pudiendo almacenar hasta 4500 átomos de hierro en su interior.

La ferritina tiene la asombrosa propiedad de ser capaz de disociarse en las distintas subunidades que la componen cuando el pH del medio se cambia a valores drásticos, bien sean ácidos o básicos. Una vez disociada, estas subunidades son capaces de re-ensamblarse cuando se vuelve al pH inicial de la disolución, adquiriendo la estructura proteica inicial. Aprovechando este fenómeno se han empleado estrategias de encapsulación del cisplatino y oxaliplatino, o bien llevando la proteína inicialmente a pH ácidos o bien llevándola a pH básico, en presencia de una disolución del compuesto de platino de interés (Figura1).

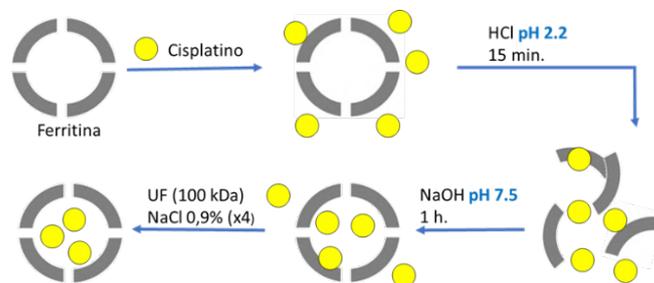
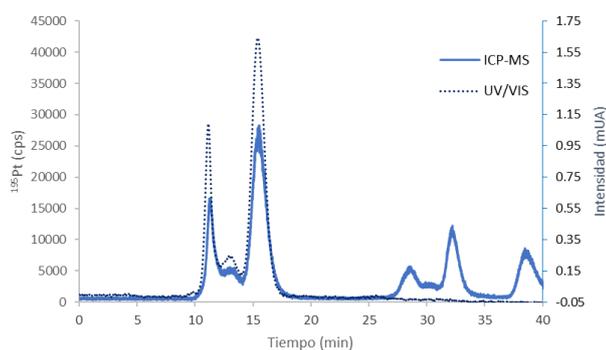


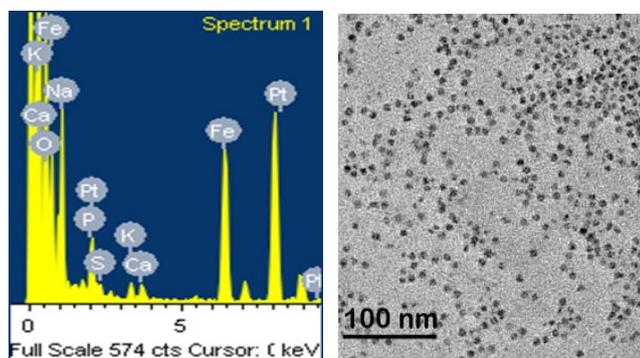
Figura 1. Esquema representativo del desensamblaje y re-ensamblaje de la ferritina en presencia de cisplatino.

Una vez re-ensamblada, la caracterización se llevó a cabo mediante estudios de cromatografía de exclusión por tamaños acoplada en línea al ICP-MS y a la detección UV-VIS donde, en todos los casos, se pudo observar un

pico mayoritario correspondiente al tiempo de retención del patrón de ferritina (aproximadamente 15,5 min) que mostraba absorción a 280 nm así como la presencia de Pt (Figura 2). Pudo observarse, además, la presencia de oligómeros de la proteína (eluyen a unos 10 minutos) que generan fácilmente a partir de la proteína monomérica durante el tratamiento. Igualmente, puesto que la proteína contiene además Fe en su interior en forma nanoparticulada, fue posible llevar a cabo medidas de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) así como análisis elemental (EDX) del interior de la cápside proteica con los resultados que se muestran en la Figura 3 (a y b) respectivamente.



**Figura 2.** Cromatograma obtenido mediante SEC-UV/ICP-MS de la ferritina después de la incorporación de oxaliplatino en su interior. Los picos de Pt observados a mayores tiempos de retención corresponden al oxaliplatino remanente sin encapsular y a sus productos de hidrólisis.



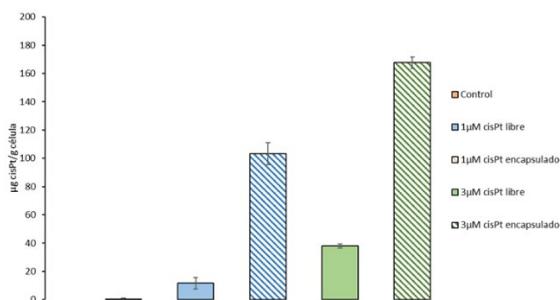
**Figura 3.** Resultados obtenidos de la proteína re-ensamblada mediante TEM donde se puede observar las nanopartículas esféricas de óxido de Fe (aproximadamente 8 nm) del interior de la misma, así como la presencia de Pt según el análisis elemental por rayos X.

La estequiometría del encapsulado fue estimada calculando mediante ICP-MS la concentración de platino en el pico correspondiente, así como la concentración de ferritina mediante UV/VIS. Así se obtuvieron resultados de una relación molar entre el cisplatino y la ferritina de 2:1, respectivamente y similar en caso de oxaliplatino. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en la literatura en estudios similares (4).

Una vez observada la correcta encapsulación del cisplatino en el interior de la proteína se estudió la liberación del fármaco desde su interior. La eficacia de la ferritina como nanotransportador no solo se basa en la posibilidad de encapsular el fármaco sino también en su correcta incorporación al interior celular, la liberación del fármaco una vez incorporada al citosol de la célula y, finalmente, la unión del cisplatino con el ADN para generar los aductos correspondientes que induzcan daño celular. Por ello es preciso verificar la correcta liberación del fármaco mimetizando las condiciones del interior celular. La estrategia consistió en la realización de un estudio *in vitro* incubando la ferritina en cuyo interior se encuentra el cisplatino a diferentes valores de pH y a distintos tiempos. Los pH empleados para las incubaciones se escogieron para intentar imitar diferentes condiciones fisiológicas, así por ejemplo se estudió un pH= 5 para mimetizar el medio ácido de los endolisomas en los que la ferritina se encontrará tras su entrada al citosol celular, un pH= 8,2 que simula las condiciones del jugo pancreático, un pH= 6,5 típico del ambiente tumoral y, finalmente, un pH fisiológico de 7,4. Los resultados obtenidos revelaron una única tendencia a liberar el cisplatino con el tiempo cuando la ferritina se encuentra en el pH ligeramente ácido (pH 5,5). Para el resto de las incubaciones se observó un ligero aumento en el platino libre en las primeras horas, que vuelve a su valor inicial prácticamente al cabo de 48 h. Estos resultados muestran la elevada estabilidad de la ferritina para su empleo como nanotransportador, siendo especialmente importante su comportamiento a pH fisiológico y al pH de los endolisomas celulares ya que deja entrever que el cisplatino se mantendrá en el interior de la ferritina protegido de interacciones inespecíficas tras su administración por vía intravenosa hasta alcanzar e introducirse en las células, en donde el pH ligeramente ácido propiciará su liberación de la ferritina de forma controlada. Así se podría evitar uno de los problemas asociados al cisplatino, su interacción con proteínas del suero y su posterior inactivación.

Estudios posteriores abordaron el empleo de la ferritina encapsulada en células en cultivo. Para ello se estudió un cultivo celular de cáncer de ovario, el sexto más frecuente entre las mujeres con una cifra de nuevos casos anuales de 205.000 mujeres en todo el mundo y ocupando entre un 4 y un 5 % de los tumores femeninos, según la Asociación Española Contra el Cáncer. La línea celular empleada fue la línea de cáncer de ovario sensible al cisplatino A2780 y se trató con la misma concentración del fármaco libre y encapsulado a concentraciones de 1 y 3  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos tras la medida de las células se muestran en la Figura 4.

En la Figura 4 se puede observar cómo empleando la misma concentración, el cisplatino en su forma encapsulada tiene una mayor capacidad de incorporación al citosol celular que el cisplatino en su forma libre en un factor de entre 4 y 9 veces.



**Figura 4.** Resultados obtenidos de la incorporación celular de cisplatino en su forma libre y encapsulado en la ferritina a diferentes concentraciones.

Estos resultados concuerdan con el hecho de que los mecanismos de entrada del cisplatino libre son diferentes a los encontrados para el cisplatino en su forma encapsulada. Mientras que el primero presenta mecanismos de entrada mayoritariamente dependientes del receptor de membrana CTR1, el cisplatino encapsulado puede hacer uso de los mecanismos de entrada de la ferritina al citosol mediante receptores específicos de ferritina e incluso, algunas investigaciones apuntan a la posible incorporación vía el receptor de transferrina (TfR1), altamente expresado en células tumorales (5). Es un resultado realmente interesante que muestra como el hecho de encapsular el fármaco permite superar uno de los grandes obstáculos encontrados en el empleo del cisplatino en clínica utilizando la ferritina como caballo de Troya y puede contribuir a la mejora en el transporte intracelular de cisplatino (6).

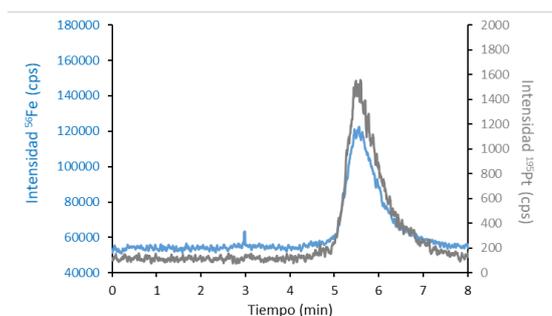
**B) Las nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas para el transporte de cisplatino.**

Como se mencionó previamente, existe una gran variedad de nanotransportadores que pueden ser empleados para la mejora del tratamiento con agentes quimioterapéuticos, entre los cuales se encuentran los ya mencionados líposomas, nanoestructuras proteicas, polímeros o nanopartículas. Entre todos estos nanotransportadores las nanopartículas de hierro son una interesante opción por su elevada biocompatibilidad que les confiere unas propiedades muy ventajosas. Sin embargo, estas nanopartículas requieren el empleo de recubrimientos que permitan su estabilización y en algunas ocasiones su funcionalización. En este sentido, en estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación se puso a punto la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro de tamaño inferior a 10 nm recubiertas de ácido adípico y tartárico, ambos biocompatibles, y con un núcleo metálico que buscaba imitar la estructura de la ferritina (7, 8). Estas nanopartículas, actualmente en ensayo clínico fase III para el tratamiento por vía oral de la anemia mostraron gran estabilidad, así como una eficaz entrada en el citosol celular por endocitosis.

Por tanto, se abordó la posibilidad de emplear dichas nanopartículas como estructuras transportadoras, en

este caso, de un fármaco precursor de cisplatino. Estos pro-fármacos están basados en complejos de Pt (IV) que en el interior celular presentan la capacidad de reducirse a Pt (II) con una estructura inicial tal que tras la reducción el compuesto generado sea el cisplatino. Concretamente se empleó el cis-diaminotetracloroplatino (IV), un compuesto similar al cisplatino con la salvedad de tener dos ligandos cloruro adicionales en posición axial que generan una estructura octaédrica en lugar de la plano-cuadrada propia del cisplatino (9). El hecho de emplear dos ligandos cloruros como ligandos adicionales radica en el potencial de reducción del complejo formado, que hace que su reducción intracelular sea mucho más rápida que en el caso del empleo de otros ligandos como acetatos o grupos hidróxidos. Esto es fundamental a la hora del diseño de un pro-fármaco pues éste debe ser “activado” en el interior celular al reducirse en presencia de moléculas tales como el glutatión o al ácido ascórbico, consiguiendo formar así cisplatino.

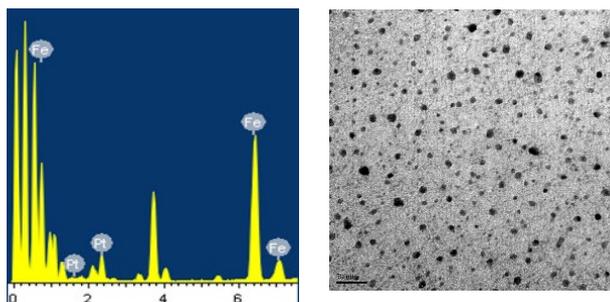
Una vez sintetizadas las nanopartículas de acuerdo a publicaciones anteriores (7), se conjugaron con el pro-fármaco y se caracterizaron empleando diferentes estrategias. Entre ellas, cabe destacar el empleo de la cromatografía de líquidos en fase inversa modificada con la adición de tensoactivos (SDS) en la fase móvil, lo que permite una separación de nanopartículas en función de su tamaño y también del exceso de pro-fármaco libre (10). Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 5 donde se observa la coelución de Pt y Fe dentro del mismo pico cromatográfico. Además, en la Figura 6 se puede ver la imagen por TEM de las nanopartículas en estudio y de su análisis elemental obtenida mediante EDX.



**Figura 5.** Cromatograma obtenido mediante HPLC-ICP-de las nanopartículas después de ser tratadas para inmovilizar el pro-fármaco sobre la superficie.

A continuación, se evaluó, la eficacia del pro-fármaco nanoestructurado sintetizado en modelos celulares de cáncer de ovario. Para ello, en este caso, a diferencia del anterior, se empleó la estrategia de cuantificación de célula individual con ICP-MS como sistema de detección (sc-ICP-MS). Dos células producidas a partir de la misma célula precursora durante la mitosis pueden mostrar diferencias en sus genomas, transcriptomas y proteomas después de varias divisiones.

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \quad [1]$$



**Figura 6.** Resultados obtenidos de las nanopartículas mediante TEM donde se puede observar las nanopartículas esféricas de óxido de Fe de aproximadamente 6 nm así como la presencia de Pt en su superficie según el análisis elemental por rayos X.

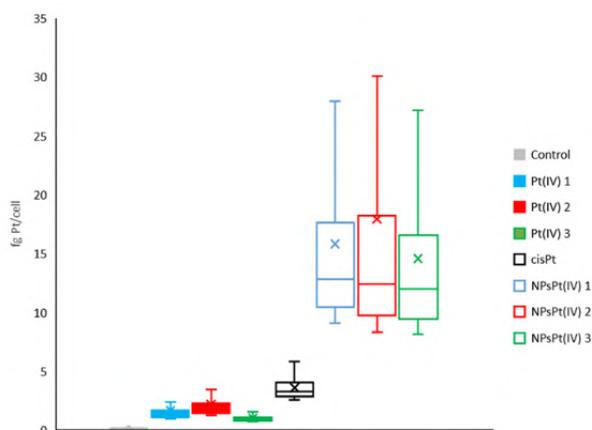
Esta heterogeneidad puede ser la causa de diferentes enfermedades y se puede apreciar en muchos aspectos de la célula, como puede ser la susceptibilidad al tratamiento con diferentes fármacos. De todo lo anterior deriva el interés en los análisis de células individuales, en contraposición a las medidas globales o en “bulk”. En estas últimas, se utilizan muestras celulares de un elevado número de células que se lisan o se digieren para seguidamente cuantificar el contenido de los analitos de interés mediante la técnica adecuada. El resultado de esta determinación se normaliza finalmente al contenido celular de partida utilizando parámetros como el número de células, peso seco o la concentración proteica, determinada previamente. Este tipo de análisis proporciona información del contenido medio de la especie química determinada en la muestra, asumiendo que todas las células de la muestra se comportan de manera homogénea. No obstante, la variabilidad existente entre las células individuales de una muestra implica una pérdida de información sobre la distribución de la especie química en la muestra pudiendo incluso ocultar la existencia de diferentes subpoblaciones en la misma. Mediante estrategias de sc-ICP-MS se puede además conocer la concentración intracelular de Pt llevando a cabo un calibrado del elemento inorgánico y realizando las transformaciones matemáticas correspondientes. Las condiciones para llevar a cabo estudios de sc-ICP-MS implican (11):

- El empleo de suspensiones celulares diluidas.
- El uso de sistemas de introducción de muestras que permiten elevada eficacia de transporte minimizando el riesgo de lisis de las células.
- La medida en el analizador de masas con alta resolución temporal (en los milisegundos o microsegundos).

El uso de patrones elementales líquidos para la cuantificación en células individuales implica la medida de un calibrado externo del elemento en las mismas condiciones experimentales que las células. Tras obtener la recta de calibrado, la masa del elemento en cada célula individual se puede obtener utilizando la ecuación [1]:

Donde  $m_c$  es la masa del elemento medido en la célula,  $\eta$  es la eficiencia de transporte del patrón inorgánico (diferente a la eficacia de transporte de las células),  $F$  es el flujo de introducción de muestra,  $t$  es el tiempo de integración,  $I$  es la intensidad del evento (a la que se le resta la intensidad del fondo para evitar cualquier contribución de especies disueltas del elemento en la muestra) y  $b$  es la pendiente de la curva de calibración obtenida. Por tanto, las células tratadas con el pro-fármaco libre y conjugado con las nanopartículas así como con cisplatino fueron cuantificadas mediante sc-ICP-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7 donde se observa de forma cuantitativa un aumento significativo de la incorporación al emplear las nanopartículas como nanotransportadores del pro-fármaco frente a la utilización directa del pro-fármaco o del cisplatino.

Concretamente los valores de platino por célula ascienden a 12 fg/ célula de media, frente a los 2 fg/célula que se obtienen en el caso del empleo del pro-fármaco libre. En otros estudios previos se observó que el propio cisplatino presenta valores de incorporación celular de 3 fg/célula, lo que indica una de las ventajas de este nanotransportador que favorece el aumento de la incorporación al citosol celular. Además, otra conclusión subyace de este resultado puesto que no solo se incorporará más pro-fármaco en las células, sino que se espera que muestre unos niveles de interacciones inespecíficas en el plasma mucho menores que el cisplatino (12).



**Figura 7.** Resultados obtenidos mediante sc-ICP-MS de la incorporación del pro-fármaco de cisplatino (cajas sólidas), cisplatino (negra) y el pro-fármaco conjugado con nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas (<10 nm). Cada color representa un experimento diferente y en cada caja se muestra la mediana y el recorrido intercuartílico de los datos obtenidos.

## CONCLUSIONES

El desarrollo de metodologías analíticas que permitan estudiar los productos de síntesis, así como caracterizar su evolución en medios biológicos es imprescindible en un contexto cada vez más multidisciplinar de la investigación y en particular, en campos como la bio(nano)medicina. El presente resumen muestra que, por un lado, metodologías bien establecidas (como las cromatografías empleando fases estacionarias convencionales) pueden tener una nueva dimensión de aplicabilidad en el campo de los nanomateriales. Paralelamente, la puesta a punto de nuevas estrategias de medida adaptadas a la necesidad creciente de obtener información celular individualizada es imprescindible para contribuir al desarrollo de las terapias personalizadas. Estos ejemplos ponen de manifiesto que desde la química analítica hay muchas aportaciones posibles para la resolución de problemas multidisciplinarios donde nuestro conocimiento resulta indispensable.

## REFERENCIAS

- (1) Song M., Cui M., Liu K., "Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer" *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, 232,114205.
- (2) Farooq M., Aquib M., Farooq A., Khan D., Maviah M., Filli M., Kesse S., Boakye-Yiadom K., Mavlyanova R., Parveen A., Wang B. "Recent progress in nanotechnology-based novel drug delivery systems in designing of cisplatin for cancer therapy: an overview" *Artif. Cells Nanomed. Biochemol.*, 2019, 47, 1674-1692.
- (3) Huda S., Aftab Alam M., Kumar Sharma P. "Smart nanocarriers-based drug delivery for cancer therapy: An innovative and developing strategy" *JDDST*, 2020, 60, 102018.
- (4) Yang Z., Wang X., Diao H., Zhan J., Li H., Sun. H, Guo H. "Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin". *Chem. Com.*, 2007, 33 3453-3455.
- (5) Calzolari A., Oliviero I. Deaglio S. "Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines" *Blood Cells Mol. Dis.*, 2007, 39, 82-91.
6. Turiel Fernández D., Corte-Rodríguez, M., Blanco-González, E., Bettmer, J., Montes-Bayón, M. "Analytical strategies to study the formation and drug delivery capabilities of ferritin-encapsulated cisplatin in sensitive and resistant cell models". *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412, 6319-6327.
- (7). García Fernandez, J., Sanchez-Gonzalez, C., Bettmer, J., Llopis, J., Jakubowski, N., Panne, U. and Montes-Bayon, M. "Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures" *Anal. Chim. Acta*, 2018, 139, 24-30.
- (8). Garcia-Fernandez, J., Turiel, D., Bettmer, J., Jakubowski, N., Panne, U., Rivas García, L., Llopis, J., Sánchez González, C., Montes-Bayón, M. "In vitro and in situ experiments to evaluate the biodistribution and cellular toxicity of ultrasmall iron oxide nanoparticles potentially used as oral iron supplements", *Nanotoxicology*, 2020, 14, 388-403.
- (9). Shi Y., Liu S., Kerwood D., Goodisman J., Dadrowiak J., "Pt (IV) complexes as prodrugs for cisplatin" *J. Inor. Biochem.*, 2012, 107, 6-14.
- (10). Montes-Bayón M. and Bettmer J. "The use of high performance liquid chromatography—Inductively coupled plasma-mass spectrometry in the analysis of inorganic nanomaterials". *Comprehensive Analytical Chemistry. Analysis and Characterization of metal based nanomaterials*. Eds. Wilson & Wilson's, 2021.
- (11). Corte-Rodríguez, M., Álvarez-Fernández García, R., Garcia Cancela, P., Bettmer, J., Montes-Bayón, M. "Single Cell ICP-MS using on-line sample Introduction systems: current developments and remaining challenges". *TRAC*, 2020, 132, 116042.
- (12). Turiel-Fernández D., Gutiérrez-Romero L., Corte-Rodríguez M., Bettmer J. and Montes-Bayón M. "Ultrasmall iron oxide nanoparticles cisplatin (IV) prodrug nanoconjugates: ICP-MS based strategies to evaluate the formation and drug delivery capabilities in single cells". *Anal. Chim. Acta*, 2021, 1159, 338356.