

### EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE RODIO COMO NUEVO AGENTE FOTOSENSIBILIZANTE EN TERAPIA FOTODINÁMICA CONTRA EL CÁNCER

Andrés Machuca Marcos, Alejandro García García, Gabriel Adolfo Peñalver Sánchez, Estefanía García-Calvo, José L. Luque-García

*Grupo de Química Bioanalítica. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040, Madrid*

#### 1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el empleo de nanomateriales como agentes terapéuticos ha cobrado gran importancia en el campo de la biomedicina debido a las propiedades únicas que emergen como consecuencia de su carácter nanométrico, y a la posibilidad de ser funcionalizadas mediante distintas modificaciones de su superficie. Dentro de estas aplicaciones terapéuticas se encuentra la terapia fotodinámica (PDT), la cual se basa en el empleo de dos componentes que actúan de forma sinérgica: un agente fotosensibilizante y una fuente de radiación electromagnética. Ninguno de estos componentes presenta toxicidad de forma individual; sin embargo, su combinación sí produce un efecto citotóxico significativo [1,2]. La principal ventaja de este tipo de terapia es que el agente fotosensibilizante puede ser activado de forma específica y dirigida mediante el uso de láseres de baja energía aplicados en el área donde se localice el tumor. Habitualmente se emplea radiación infrarroja cercana (NIR) ya que constituye una fuente de radiación no ionizante y con elevada penetrabilidad en los tejidos [3]. En PDT, el agente fotosensibilizante puede transferir la energía absorbida de la radiación al oxígeno molecular, dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) [4], las cuales generan daño oxidativo capaz de inducir apoptosis e impedir el crecimiento de las células oncogénicas. La PDT, por tanto, es una alternativa no invasiva y muy prometedora en comparación con otros tratamientos tradicionales como la cirugía o la radioterapia [5].

Combinando la selectividad de la PDT y el potencial de las nanopartículas metálicas, es posible plantear una estrategia firme de lucha contra el cáncer [6,7]. Esta combinación se basa en el aprovechamiento de las características de las nanopartículas metálicas (NPs), las cuales son capaces de absorber radiación electromagnética y transformarla en energía química, lo que las convierte en potenciales agentes fotosensibilizantes. Esto permite solventar algunos problemas comúnmente encontrados en el uso de compuestos orgánicos empleados como agentes fotosensibilizantes en PDT contra el cáncer, como son la hidrofobicidad, la baja estabilidad y la falta de selectividad [8].

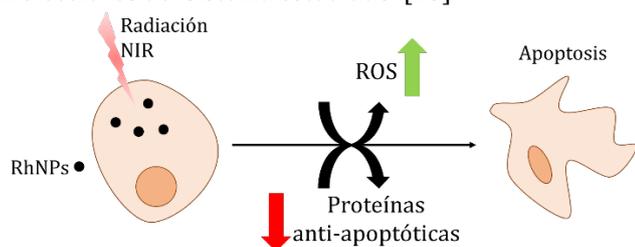
Los metales y los compuestos metálicos tienen un interesante recorrido en cuanto a su aplicación en el campo de la biomedicina y, concretamente, en el desarrollo de nuevos materiales con actividad antitumoral. En concreto, algunos compuestos organometálicos de Rh en varios estados de oxidación (I, II, III), han mostrado presentar un potencial efecto

antitumoral como agente fotosensibilizante en PDT [9,10]. Sin embargo, a pesar de todos los avances dentro del campo de la nanotecnología de los últimos años, hay descritos pocos procedimientos de síntesis de nanopartículas de Rh (RhNPs), de las cuales tampoco existe información sobre su comportamiento biológico o sus potenciales aplicaciones biomédicas.

Por todo ello, parte de la investigación que se desarrolla en nuestro laboratorio se centra en investigar las potenciales aplicaciones que tienen las RhNPs como agentes fotosensibilizantes en el tratamiento fotodinámico contra el cáncer. En este sentido, se describe tanto la síntesis como la caracterización analítica y funcional de estas nanopartículas, para la evaluación del efecto fotodinámico al ser combinadas con radiación en el infrarrojo cercano (NIR) (Figura 1). Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio de los mecanismos biomoleculares implicados en la respuesta citotóxica mediante técnicas de transcriptómica y metabolómica, ya que ambas son herramientas analíticas que nos ayudan a caracterizar sistemas biológicos a nivel molecular [11,12]. Por un lado, las técnicas transcriptómicas permiten analizar y comparar los niveles de expresión de mRNAs de dos o más muestras. Esto se lleva a cabo, generalmente, mediante el uso de microarrays de DNA [14], en los cuales se hibridan de forma conjunta los cDNAs obtenidos a partir de los mRNAs extraídos de las muestras. El análisis se realiza mediante un marcaje fluorescente diferencial, siendo posible identificar y cuantificar de forma simultánea miles de transcriptos. Por otra parte, dentro de las técnicas metabolómicas se pueden integrar herramientas analíticas como la espectrometría de masas (MS) acoplada a técnicas de separación cromatográficas (LC o GC) para la cuantificación diferencial de metabolitos en extractos celulares, abarcando un amplio rango de compuestos de diferente naturaleza. Existen dos tipos de aproximaciones en cuanto a la magnitud de los metabolitos analizados: (i) metabolómica dirigida y (ii) metabolómica no dirigida. En el primer caso, se valida o se obtiene información relativa a una ruta metabólica concreta mediante el análisis de un metabolito o grupo de metabolitos previamente definido [13]. En el segundo caso, en cambio, se lleva a cabo un análisis masivo abarcando el mayor grupo de analitos posible con el objetivo de identificar aquellos que se encuentren diferencialmente alterados tras el tratamiento.

De esta forma, mediante la combinación de ambas técnicas ómicas y la integración de sus resultados se puede obtener una gran cantidad de información que

nos permita elucidar los mecanismos y procesos moleculares del sistema estudiado [13].



**Figura 1.** Esquema de la terapia fotodinámica (PDT) basada en el uso de RhNPs como agente fotosensibilizante.

Este tema se encuentra dentro de la línea de investigación del grupo de Química Bioanalítica (QBA) del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, centrada en el diseño, síntesis y estudio de nanopartículas metálicas y nanosistemas híbridos con aplicaciones biomédicas. En el presente artículo se hace un breve resumen de los avances realizados en nuestro laboratorio para el estudio de las propiedades de las RhNPs como nuevo agente fotosensibilizante para su uso en PDT contra el cáncer.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Síntesis y evaluación funcional del material *in-vitro*

La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante un proceso de reducción en polialcoholes del tricloruro de rodio (III) en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante. Mediante este procedimiento se produce la reducción del precursor metálico en disolución empleando un polialcohol, como es el etilenglicol (EG), que funciona a su vez como disolvente y reductor. Esta reducción tiene lugar a altas temperaturas (temperatura de ebullición del disolvente). El material obtenido se caracterizó mediante una amplia batería de técnicas analíticas como microscopía de transmisión electrónica y análisis dispersivo de rayos X (TEM/EDS), difracción de rayos X (XRD), dispersión dinámica de luz y medida del potencial Z (DLS/ZPot).

La principal característica de un agente fotosensibilizante es su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno tales como el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), al ser expuesto a radiación externa. Para comprobar el potencial del material sintetizado como nuevo agente fotosensibilizante, se estudió esta capacidad de provocar un efecto fotodinámico tanto en suspensión acuosa como en un modelo celular *in vitro*. La evaluación en suspensión acuosa se llevó a cabo mediante el uso de una sonda molecular como es el difenilisobenzofurano (DPBF), la cual se oxida en presencia de oxígeno singlete, una de las principales ROS que se genera en los procesos fotodinámicos. De esta forma, la capacidad del material de generar dicho efecto

será directamente proporcional a la pérdida de absorbancia de la sonda. Por otro lado, para la evaluación *in-vitro*, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular (MTT) empleando la línea celular HeLa como modelo pre-clínico. Las células fueron sembradas en placas P96 y expuestas a RhNPs durante 24 h. Posteriormente las células se sometieron al tratamiento con radiación infrarroja (NIR) durante 10 min. Tras 48 h de incubación post-tratamiento, se añadió el reactivo MTT y se determinó la viabilidad celular mediante medidas de absorbancia del formazán obtenido como producto de la actividad metabólica de las células viables.

### 2.2 Evaluación del mecanismo de toxicidad

#### 2.2.1 Perfil transcriptómico

Para la evaluación del perfil transcriptómico se llevó a cabo la extracción y purificación del RNA de las muestras tras su tratamiento fotodinámico. Seguidamente, se cuantificó el contenido total de mRNA mediante espectrofotometría y las muestras fueron procesadas empleando el kit GenChip® WT PLUS Reagent (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), siendo hibridadas finalmente sobre un microarray Clariom™ Array (Applied Biosystems) el cual contenía las secuencias del genoma humano completo. La medida de fluorescencias se realizó en un equipo GeneChip® Scanner 3000 7G (Applied Biosystems). Los datos fueron tratados mediante el algoritmo multi-array (RMA) para la normalización y el análisis de los niveles de expresión de cada gen. Para cada una de las condiciones experimentales (controles o tratados) se realizaron 3 réplicas biológicas, calculándose la relación de intensidades de fluorescencia o “Fold Change” entre ambas muestras (tratadas vs. controles) a partir de la media de las réplicas. Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo empleando un test t moderado (Limma) para el análisis de expresión diferencial.

#### 2.2.2 Estudio del perfil metabólico mediante metabolómica no dirigida

Tras la evaluación de la alteración de los niveles de expresión génica se llevó a cabo un análisis a nivel metabólico con el objetivo de encontrar aquellos metabolitos que estuvieran alterados tras someter a las células al tratamiento fotodinámico. Una de las técnicas analíticas más empleadas para este tipo de análisis es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-TOF-MS), la cual nos permite, previa derivatización de los metabolitos, cuantificar e identificar de forma fiable los compuestos encontrados. La extracción de los metabolitos se realizó empleando una mezcla de disolventes de distintas polaridades, como son  $H_2O/MeOH/CHCl_3$  para garantizar la extracción de un mayor número de

compuestos de distinta naturaleza, empleando disolventes fríos (-20 °C en el caso de MeOH/ACN y 4 °C en el caso del H<sub>2</sub>O) y realizando la extracción en hielo para evitar la degradación de los metabolitos durante este proceso (“*quenching*” del metabolismo). Durante la extracción se añadió ácido 4-fenilbutírico a cada muestra a modo de patrón interno. Así, tras la lisis celular y previa centrifugación, se obtuvo un extracto dividido en dos fases (una polar y otra apolar) separados por una interfase en la que aparecieron precipitadas las proteínas. Se tomaron alícuotas por separado de cada una de las fases líquidas y se evaporó el disolvente a sequedad para, finalmente, someter a los compuestos a una derivatización en dos etapas: una primera con metoxiamina en piridina durante 90 min a 37 °C y una segunda con 1% cloruro de trimetilsililio (TMCS) en BSTFA. Tras la derivatización, las muestras fueron filtradas a través de filtros de PTFE de 0.22 μm y analizadas mediante GC-TOF-MS (7890A, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Las áreas de cada pico fueron normalizadas con el contenido de proteína total que se obtuvo de cada interfase, cuantificados mediante un ensayo Bradford, y la identificación de los metabolitos se realizó con la base de datos NIST. Se prepararon 7 réplicas para cada una de las condiciones y el análisis de los datos se realizó mediante el cálculo de las relaciones de áreas entre muestras tratadas vs. controles, y posterior análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las alteraciones significativas entre condiciones.

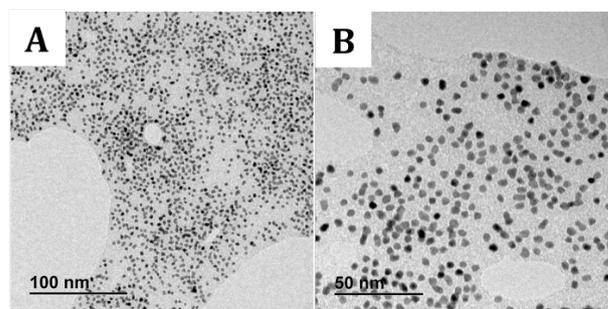
### 2.2.3 Estudio del metabolismo energético mediante estrategias de metabolómica dirigida

Con el objetivo de profundizar aún más en los mecanismos biomoleculares implicados en la respuesta citotóxica, se diseñó una estrategia de metabolómica dirigida para la cuantificación de cuatro metabolitos clave dentro del metabolismo energético como son el ATP, ADP, NAD<sup>+</sup> y NADH. Para la cuantificación de estos cuatro metabolitos se llevó a cabo una extracción con 2% ácido fórmico en MeOH y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, realizando el “*quenching*” metabólico de igual forma que en el experimento de metabolómica no dirigida. Las muestras así preparadas fueron analizadas mediante LC-Qq-MS (LC/MS-8030 Shimadzu, Kioto, Japan) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y operando en modo MRM, usando las transiciones características de cada uno de los cuatro metabolitos para su identificación y cuantificación. Los resultados de cada muestra fueron normalizados con la cantidad de proteína total de cada una de ellas y las diferencias significativas se confirmaron mediante ANOVA y test de Bonferroni.

## 3 RESULTADOS

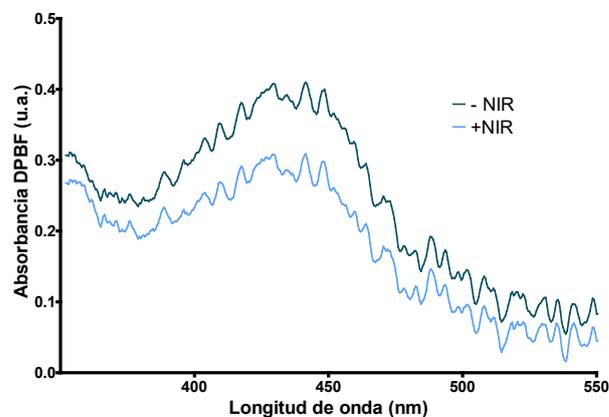
### 3.1 Síntesis y evaluación funcional del material *in-vitro*

La síntesis anteriormente descrita dio lugar a unas RhNPs caracterizadas por la homogeneidad del tamaño y la monodispersidad (Figura 2). Para la caracterización de las NPs sintetizadas, se utilizaron la espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDS) y difracción de rayos X (DRX). El espectro EDS mostró los picos esperados para el rodio a 2,6 keV, lo que indica que la composición de las nanopartículas es correcta. Además, el difractograma de DRX mostró los picos ensanchados y de baja intensidad esperados para las nanopartículas, confirmando, mediante comparación con bases de datos, la existencia de fase rodio metálico. Así, se comprobó la obtención de nanopartículas de rodio metálicas monodispersas con un tamaño comprendido entre los 4-5 nm.



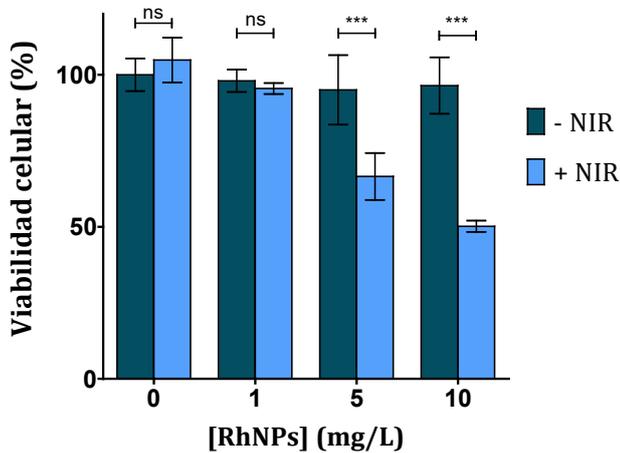
**Figura 2.** Micrografías de las RhNPs sintetizadas obtenidas mediante TEM.

El rendimiento fotodinámico de las RhNPs se confirmó por la disminución de la absorbancia de la sonda DPBF tras la irradiación con NIR de una suspensión acuosa de RhNPs (Figura 3). Se observó una disminución de aproximadamente el 30% en la absorbancia, lo que indica la oxidación de la sonda debido a la generación de oxígeno singlete en la suspensión de RhNPs al irradiación con NIR.



**Figura 3.** Absorbancia del DPBF antes (-NIR) y después (+NIR) de irradiar con NIR.

La toxicidad intrínseca (sin radiación NIR) y la inducida por NIR de las RhNPs sintetizadas se evaluó mediante un ensayo de viabilidad celular *in-vitro* basado en la reducción del reactivo MTT. Tras confirmar la buena biocompatibilidad del láser de infrarrojo y la inocuidad de las RhNPs en sí mismas a las concentraciones evaluadas, se demostró el potencial fotodinámico de estas nanopartículas (Figura 4).



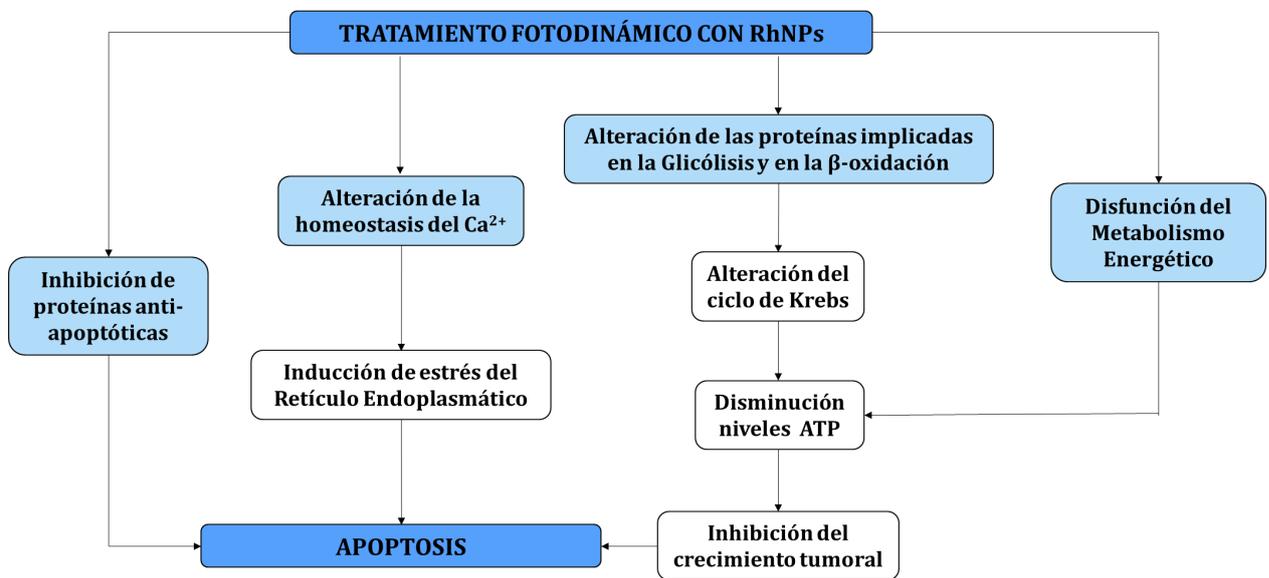
**Figura 4.** Efecto sobre la viabilidad celular de la exposición a RhNPs (-NIR) y a RhNPs en combinación con radiación NIR (+NIR).

Por otro lado, se evaluó tanto su localización en el interior celular, como su capacidad para inducir muerte

celular apoptótica. Deduciendo de estos resultados la localización de las RhNPs en endosomas y originando apoptosis celular en aquellas células en las que se internalizaban [15].

**3.2 Evaluación del mecanismo de toxicidad**

Finalmente, para completar la evaluación del mecanismo de toxicidad de las RhNPs, se llevó a cabo un estudio multi-ómico. Dos grandes técnicas ómicas como son la transcriptómica y la metabolómica, permitieron relacionar el tratamiento con RhNPs e irradiación NIR con la inhibición de proteínas citoprotectoras clave, dando lugar a la inducción de apoptosis por un mecanismo independiente de p53 (Figura 5). Además, este tratamiento desencadenó la generación de ROS tanto citosólicas como mitocondriales originando daño oxidativo. Esto parece ser debido a la desregulación de la producción de energía causada principalmente por la alteración del metabolismo de los ácidos grasos (bloqueo de la  $\beta$ -oxidación) y el bloqueo total de las rutas de obtención de energía, como la glucólisis y la síntesis de ATP [16]. Este hecho se ha visto relacionado con la disminución de la capacidad de migración y el carácter invasivo de las células HeLa, lo cual pudimos confirmar mediante ensayos de invasión celular.



**Figura 5.** Esquema de los procesos biomoleculares implicados en la respuesta citotóxica inducida por el tratamiento con PDT asistido por RhNPs en células HeLa.

#### 4 CONCLUSIONES

En la presente comunicación se resumen algunos de los resultados más relevantes obtenidos por nuestro grupo de investigación en relación al estudio de las nanopartículas de rodio como nuevo agente fotosensibilizante en terapia fotodinámica frente a cáncer. Así, se ha demostrado la capacidad de estas nanopartículas de generar un efecto fotodinámico al ser expuestas a radiación infrarroja y el impacto que este tiene sobre la viabilidad celular mediante varios ensayos *in-vitro*. Además, se ha profundizado en el estudio de los mecanismos biomoleculares implicados en la respuesta citotóxica al tratamiento descrito, demostrándose así el potencial de dichas nanopartículas de ejercer un efecto anti-tumoral al combinarse con radiación infrarroja. Por último, se evidencia la necesidad de continuar la investigación de este material con aplicaciones biomédicas, ya que hasta la fecha existe poca información al respecto.

#### 5 NUEVOS RETOS

Actualmente el grupo sigue avanzando en este campo mediante el estudio de la expresión diferencial de proteínas empleando el método SILAC para el descubrimiento de nuevas proteínas alteradas y otros métodos de validación de los resultados obtenidos como citometría de flujo.

A la vista de los resultados obtenidos hasta ahora, y con la intención de mejorar aún más las características de selectividad de las RhNPs frente a las células tumorales, estamos trabajando en el diseño, síntesis y caracterización de nuevos nanosistemas híbridos basados en el uso de nanopartículas de sílice mesoporosa como soporte para su vehiculización. El uso de este material de sílice mesoporoso permitirá, por un lado, la funcionalización de la superficie del material híbrido con ligandos selectivos (tales como proteínas o péptidos) que sean capaces de reconocer de forma específica a las células tumorales, consiguiendo así una

internalización selectiva de las nanopartículas de rodio. Y, por otro lado, el carácter mesoporoso que presenta este nuevo material híbrido hace posible cargar los poros con fármacos que actúen de forma sinérgica con el tratamiento fotodinámico descrito.

#### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto PID2020-114529RB-I00. A. Machuca Marcos agradece al Banco Santander y a la Universidad Complutense de Madrid por la concesión del contrato predoctoral de personal investigador en formación (CT82/20-CT83/20).

#### REFERENCIAS

- [1] Dolmans, D. et al. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 380–387 (2003).
- [2] Ozog, D. M. et al. *Dermatologic Surg.* 42, 804–827 (2016).
- [3] Saneja, A. et al. *Drug Discov. Today.* 23, 1115–1125 (2018).
- [4] Zhang, Q. et al. *Union Oncol.* 23, 561–567 (2018).
- [5] Abrahamse, H. et al. *Photomed. Laser Surg.* 35, 581–588 (2017).
- [6] Cormode, D.P. et al. *Contrast Media Mol. Imaging.* 9, 37–52 (2014).
- [7] Kłębowski, B. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 4031–4047 (2018).
- [8] He, L. et al. *J. Mater. Chem.* 4, 4455–4461 (2016).
- [9] Desoize, B. *Anticancer Res.* 24, 1529–1544 (2004).
- [10] Katsaros, N. et al. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 297–308 (2002).
- [11] Estevez, H. et al. *Pharmaceutics.* 13, 356 (2021).
- [12] Garcia-Calvo, E. et al. *Food Chem. Toxicol.* 146, 111849 (2020).
- [13] Chakraborty, S. et al. *Biomed Res. Int.* 9836256 (2018).
- [14] Hasin, Y. et al. *Genome Biol.* 18, 1–15 (2017).
- [15] Machuca, A. et al. *Chem. Eur. J.* 26, 7685–7691 (2020).
- [16] Machuca, A. et al. *Pharmaceutics* 13, 1629 (2021).