

## EFECTO SINÉRGICO DE LA APLICACIÓN CONJUNTA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y EL ANTICUERPO TRASTUZUMAB SOBRE CÉLULAS TUMORALES QUE SOBRE-EXPRESAN HER2

Synergistic effect of magnetic nanoparticles and trastuzumab antibody on tumor cells over-expressing Her2

Anilo Albornoz<sup>2</sup>, Tatiana Fandiño<sup>3</sup>, Sarah Briceño<sup>4</sup>, Jaheli Fuenmayor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela. <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Celular. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo Venezuela. <sup>3</sup>Hospital Oncológico "Padre Machado". Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela. <sup>4</sup>Laboratorio de Materiales. Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.  
jfuenmay@ivic.gob.ve

### RESUMEN

Los materiales nanoestructurados representan en la actualidad una propuesta atractiva para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. Entre ellas, las nanopartículas (NPs) magnéticas tienen aplicaciones potenciales en el diagnóstico y tratamientos de tumores, gracias a su capacidad de ser retenidas en la vasculatura tumoral y de poder ser detectadas usando resonancia magnética. En particular, las NPs de ferrita de cobalto con Azul de Prusia tienen además, aplicación potencial en el campo de la hipertermia y la imagenología por ultrasonido. Por otro lado, estas propiedades pueden ser combinadas con las de agentes terapéuticos tales como los anticuerpos, los cuales le imprimen mayor especificidad por el tumor. En el presente trabajo, se trataron células de cáncer de mama que sobre-expresan el antígeno tumoral HER2 con una combinación del anticuerpo terapéutico trastuzumab y NPs de Azul de Prusia y ferrita de cobalto. La aplicación conjunta de estos agentes produjo un efecto evidente sobre el número de células vivas en el cultivo – medida en términos de número de células y permeabilidad al Bromuro de Etidio –, así como cambios en el pH del citoplasma celular detectados con el cromógeno vital naranja de acridina, empleando la técnica de microscopía de fluorescencia.

Estos cambios son sugestivos de daños en la fisiología de la célula tumoral que podrían estar involucrados con su muerte prematura, y que pueden evidenciar un efecto sinérgico de la aplicación conjunta de las nanopartículas con el anticuerpo.

**Palabras clave:** pH celular; anticuerpo terapéutico; cáncer de mama; permeabilización lisosomal

### ABSTRACT

Nanostructured materials represent an attractive proposal for a wide variety of biomedical applications. Among them, magnetic nanoparticles (NPs) have potential applications in the diagnosis and treatment of tumors, thanks to their ability to be retained in the tumor vasculature and to be detected using magnetic resonance. In particular, the cobalt ferrite NPs with Prussian Blue also have potential application in the field of hyperthermia and ultrasound imaging. On the other hand, these properties can be combined with those of therapeutic agents such as antibodies, which give it greater specificity for the tumor. In the present work, breast cancer cells that overexpress the HER2 tumor antigen were treated with a combination of the therapeutic antibody trastuzumab and NPs of Prussian Blue and cobalt ferrite. The joint application of these agents produced an evident effect on the number of live cells in the culture - measured in terms of cell number and permeability to Ethidium Bromide -, as well as changes in the pH of the cell cytoplasm detected with the vital orange chromogen of acridine, using the technique of fluorescence microscopy. These

Recibido: 17/06/2017. Aceptado: 18/10/2017

changes are suggestive of damages in the physiology of the tumor cell that could be involved with its premature death, and that may show a synergistic effect of the joint application of the nanoparticles with the antibody.

**Keywords:** cellular pH; therapeutic antibody; breast cancer; lysosomal permeabilization

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, diversos estudios se han centrado en el uso potencial de nanopartículas (NPs) como alternativas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Estos estudios han planteado grandes expectativas ya que las nanopartículas magnéticas muestran características prometedoras para las aplicaciones biomédicas, incluyendo el diagnóstico por resonancia magnética (RM), la terapia dirigida del cáncer, la hipertermia y la liberación controlada de moléculas anticancerígenas. Adicionalmente, las nanopartículas magnéticas pueden combinarse con otras moléculas a nivel nanométrico para satisfacer diversos enfoques terapéuticos (Creixell, Bohórquez, Torres-Lugo, & Rinaldi, 2011).

La funcionalización de nanopartículas es una estrategia usada para aumentar la selectividad al tejido blanco a través de la utilización de biomarcadores. De ser exitoso, este abordaje permitiría saltar los mecanismos de resistencia celular y aumentar la concentración de las NPs en el tejido. Estas estrategias incluyen, entre otros, el reconocimiento y la unión a receptores de membrana sobrexpresados en las células blanco. La funcionalización a través de la unión a anticuerpos específicos permite que se puedan unir a antígenos específicos con una alta afinidad y especificidad. Para lograr la funcionalización de las nanopartículas se utilizan diferentes estrategias que permiten asegurar una unión controlada y preservar la estabilidad y la actividad biológica de las mismas (Fan et al., 2011). En este sentido, la bioconjugación puede tener lugar mediante interacciones electrostáticas (no covalentes), por enlaces covalentes directos entre la superficie de la NP y el anticuerpo, o mediante el uso de un adaptador de moléculas (Nobs, Buchegger, Gurny, & Allémann, 2004).

La efectividad de las nanopartículas viene modulada por su capacidad de interactuar con las células tumorales. Esta interacción se inicia, primeramente, mediante el contacto con la superficie celular y, seguidamente, por los niveles de internalización que pueda sufrir el complejo nanopartícula-receptor. Una vez dentro de la célula, los efectos de las

nanopartículas pueden ser variados y requieren de una evaluación *in vitro*. En el Laboratorio de Ingeniería de Materiales del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) se han producido una diversidad de materiales nanoestructurados con potencial uso en biomedicina, tales como las nanopartículas magnéticas de Azul de Prusia y Ferrita de cobalto. Estas nanopartículas podrían potencialmente ser utilizada en el diagnóstico y tratamiento de tumores sólidos gracias a sus propiedades intrínsecas. En el presente trabajo se probó el efecto *in vitro* de combinarse nanopartículas de Azul de Prusia y Ferrita de cobalto con el anticuerpo terapéutico anti-HER2 trastuzumab (HERCEPTIN®) sobre una línea celular de cáncer de mama que sobre-expresa HER2 (SKBR-3). Para ello, se incubaron las células SKBR-3 en presencia o ausencia del anticuerpo y las nanopartículas y se determinó el efecto de su aplicación conjunta sobre el número de células, la internalización del anticuerpo y los niveles de activación lisosomal.

## METODOLOGÍA

**Síntesis de las nanopartículas:** Las nanopartículas de ferrita de cobalto  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  se obtuvieron usando el método de descomposición térmica con un tamaño de  $5 \pm 2$  nm y posteriormente se funcionalizaron con  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en condiciones hidrotermicas de reacción a  $170^\circ\text{C}$  por 4h para obtener las nanopartículas híbridas de Azul de Prusia y Ferritas de cobalto con un tamaño promedio de  $100 \pm 20$  nm. La caracterización de las NPs se realizó usando un Microscopio Electrónico de Transmisión FEI Spirit (120 Kv).

**Cultivo celular y montaje:** Se utilizaron células SKBR-3 (adenocarcinoma mamario de origen humano que sobre-expresa HER2), obtenidas comercialmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection* ATCC, Estados Unidos de América), las cuales se descongelaron y se cultivaron en condiciones de esterilidad, a  $37^\circ\text{C}$  en frascos de  $25\text{ cm}^2$  de superficie (T-25) en medio de cultivo Mc Coy's 5A (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (0,20 Mm); (SFB, Gibco) L-glutamina (250Mm) (Sigma-Aldrich) y una mezcla de antibiótico-antimicótico (10.000 U/mL) (Gibco). Se procedió a crear una superficie de adherencia celular en laminillas cubreobjetos previamente esterilizadas, para luego colocarlas en placas de cultivo de 6 pozos. Brevemente, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de Poli-D-Lisina 0.1mg/ml (Sigma) en cada lámina cubreobjeto y se dejó 2 horas a temperatura

ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó con tampón fosfato salino y a cada lamina se le agregó la suspensión celular a razón de 1.000.000 de células por láminilla y se incubó a 37°C y 5% CO<sup>2</sup>. Se le retiró el medio suplementado y se le adicionaron 1000 µl de medio Mc Coy's sin suplementar para sincronizar el ciclo celular de las células adheridas durante 1 hora a 37°C, seguido de una incubación con medio suplementado durante 12 horas para su recuperación. Posteriormente, las células fueron tratadas durante 30 minutos a 37°C con anticuerpo trastuzumab-FITC (10 µg/mL), nanopartícula (10 µg/mL) o una combinación de ambas (mezcladas previo a su aplicación al cultivo celular), cuidando de conservar las mismas concentraciones finales en la mezcla.

**Tinción de células vivas con bromuro de etidio y naranja de acridina y observación directa:** Una vez tratadas, a un juego de células se le adicionó 50 µl de una solución de naranja de acridina y de bromuro de etidio (10 y 50 µg/mL, respectivamente) para ser visualizado inmediatamente en un microscopio de epifluorescencia. Otro juego idéntico de células fue fijado con gases de Formaldehído al 40% para ser visualizadas posteriormente.

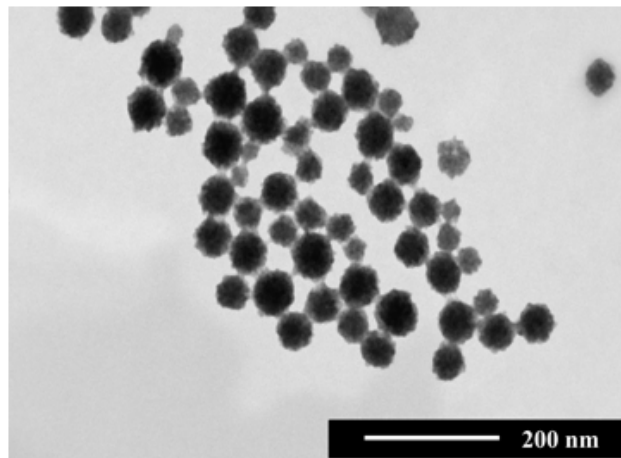
Para el análisis, se tomó una galería de fotos para cada tratamiento, tomando al menos 5 campos por cada tratamiento y 20 células por campo (total 100 células analizadas por tratamiento).

**Análisis de fotografías y organización de datos:** El análisis de la galería de fotos arriba mencionada se realizó con el programa ImageJ según protocolo (Abràmoff, Magalhães, & Ram, 2004). Se delimitaron 2 áreas en el citoplasma con una medida de 50x50 (1976 píxeles). Los datos obtenidos fueron trasladados al programa Excel 2016, y se organizaron según la longitud de onda: Rojo (R) o verde (V). En los diferentes tratamientos, se procedió a calcular el promedio de la densidad de fluorescencia.

**Análisis estadístico:** Los datos obtenidos fueron analizados mediante tablas de contingencia en el programa estadístico GraphPad Prisma 6.

## RESULTADOS

**Figura 1. Micrografía de nanopartículas de Ferrita de Cobalto y azul de Prusia.**

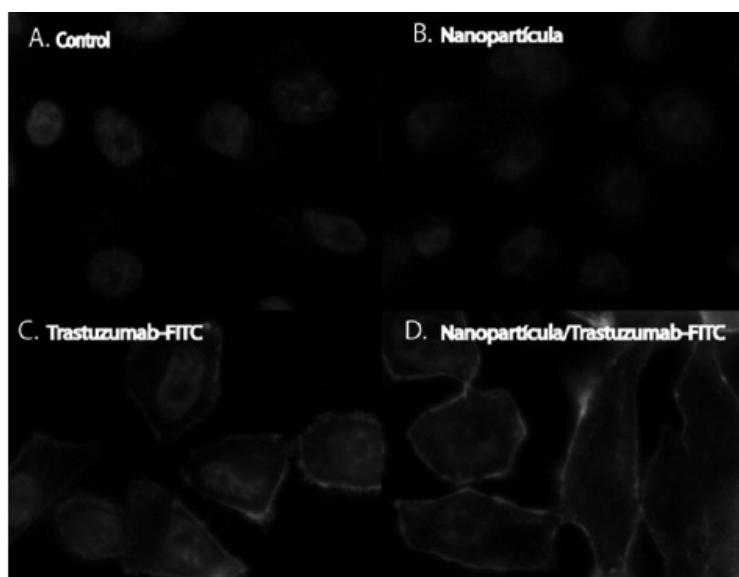


En la figura 1 se muestra una micrografía de las nanopartículas de ferrita de cobalto con azul de prusia donde se aprecia la forma y el tamaño de las mismas. Estas NPs presentan una forma regular esférica, típica de compuestos de azul de prusia preparados bajo las condiciones especificadas en la sección de métodos.

En la Figura 2, se evaluó de forma cualitativa la intensidad de fluorescencia del anticuerpo presente en la membrana de las células incubadas bajo los diferentes tratamientos. Los paneles A y B corresponden a células sin tratamiento o tratadas con nanopartícula solamente, respectivamente. En estas células solo se observa la tinción del núcleo con el marcador azul DAPI y una medición de la autofluorescencia emitida por estas células. Dado que la nanopartícula no fluoresce a la longitud de onda utilizada, no es posible observar su presencia en estas micrografías. No obstante, la presencia de la nanopartícula fue confirmada empleando un filtro para campo oscuro en el mismo microscopio (datos no mostrados). En los paneles C y D, se puede apreciar la intensidad de fluorescencia verde observada en la membrana de células tratadas con Trastuzumab-FITC (TZ-FITC) y Trastuzumab-FITC en presencia de las nanopartículas (TZ-FITC/NP). Como era de esperarse, en los dos tratamientos en los que se adicionó TZ-FITC (con y sin nanopartículas) se observa una señal claramente visible que refleja la cantidad de anticuerpo presente en la célula. De manera cualitativa, puede observarse la presencia de regiones de mayor intensidad de fluorescencia en la membrana de las células tratadas con el anticuerpo que fue previamente mezclado con las nanopartículas.

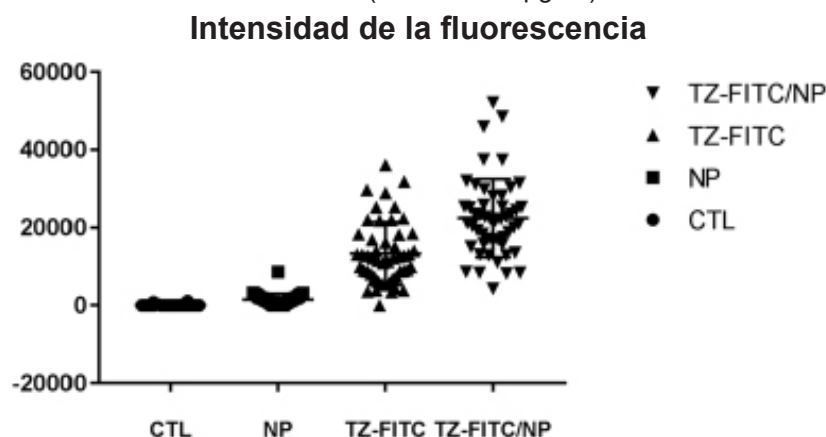
Con el fin de corroborar lo observado de manera cualitativa, estas imágenes fueron analizadas utilizando el software Image J (Figura 3). El análisis de estas mediciones a través de tablas de contingencia (usando como punto de corte el promedio de la fluorescencia medida en el grupo de Tz-FITC más una desviación estándar) detectó una relación significativa entre una alta intensidad de fluorescencia en la membrana celular y la presencia de las nanopartículas (Prueba Ji-cuadrado,  $p=0,0031$ ).

En la figura 2 también se puede observar la intensidad de fluorescencia en el citoplasma y núcleo de estas mismas células para cada tratamiento. En este caso, no se detectan de manera cualitativa diferencias algunas. Tampoco se halló una relación positiva entre la intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo y la presencia de las nanopartículas en el citoplasma (Prueba Ji-cuadrado,  $p=0,3490$ ), ni en el núcleo (Prueba Ji-cuadrado,  $p=0,5854$ ) luego del análisis con el programa Image J.



Año 2016

**Figura 2.** Micrografías de células SKBR3 tratadas con trastuzumab-FITC y/o nanopartículas de ferrita de cobalto y azul de prusia. La coloración azul corresponde al marcaje del ADN del núcleo con DAPI. Panel A(CTL): células sin tratamiento. Panel B(NP): células tratadas con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Panel C(TZ-FITC): células tratadas con Trastuzumab-FITC(10  $\mu\text{g/ml}$ ). Panel D(TZ-FITC/NP): células tratadas con Trastuzumab-FITC previamente mezclado con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia(ambos a 10  $\mu\text{g/ml}$ ).



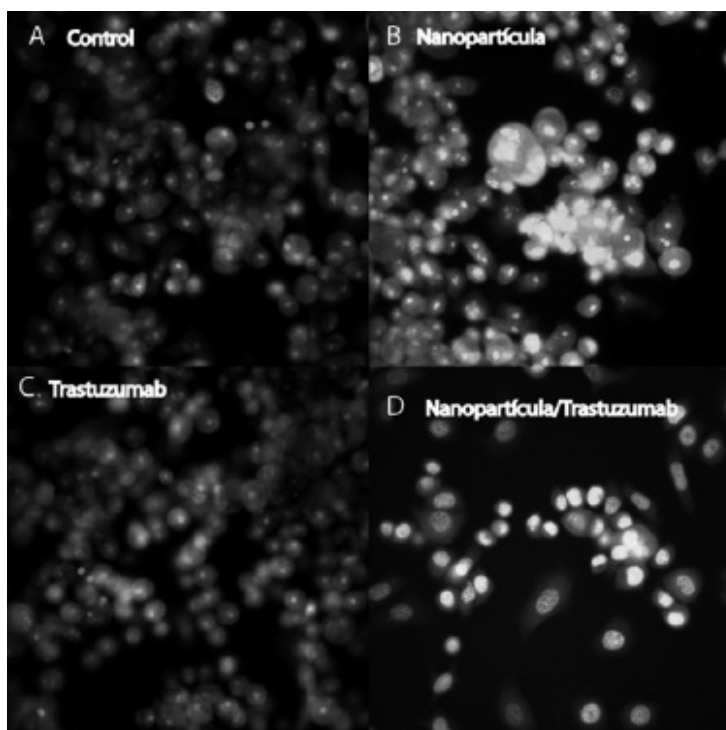
Año 2016

**Figura 3.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia verde registrada en la Fig. 2, **CTL**: células control sin tratamiento. **NP**: células tratadas con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia a 10  $\mu\text{g/ml}$ . **TZ-FITC**: células tratadas con Trastuzumab-FITC a 10  $\mu\text{g/ml}$ . **TZ-FITC/NP**: células tratadas conjuntamente con Trastuzumab-FITC y nanopartículas a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Análisis de la zona de la membrana celular.

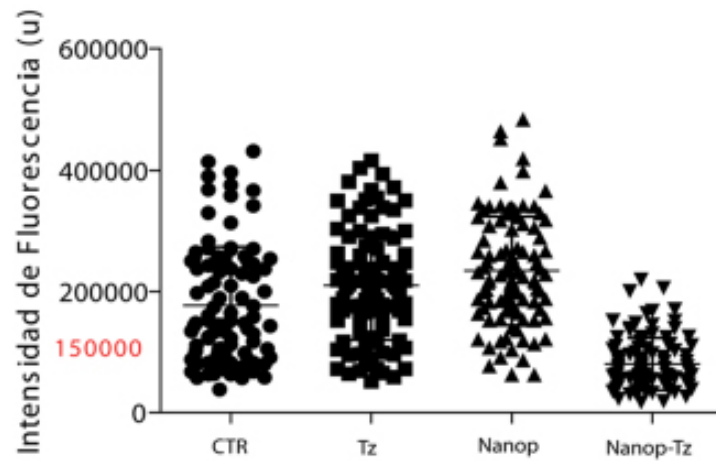
La figura 4 muestra el resultado de la evaluación cualitativa del pH citoplasmático y lisosomal de células tumorales tratadas o no con las nanopartículas magnéticas y el anticuerpo humanizado trastuzumab. En el panel A, correspondiente a las células sin tratamiento (CTL), se observa un pH esencialmente neutro en el citoplasma (coloración verde de la naranja de acridina), el cual se equipara con el de la imagen correspondiente a las células tratadas con el anticuerpo Trastuzumab (Panel B, TZ-FITC) y a las tratadas con las nanopartículas magnéticas (Panel C, NP), por separado. En la imagen correspondiente a las células tratadas conjuntamente con las nanopartículas y el anticuerpo trastuzumab (Panel D, TZ-FITC/NP), se observa una atenuación de la intensidad de fluorescencia verde con un incremento concomitante de la coloración naranja en el citoplasma, lo que es indicativo de una disminución del pH citoplasmático por un probable compromiso de la membrana lisosomal. En algunos casos, se observa además una coloración naranja en el núcleo celular, que indica el ingreso del bromuro de etidio al núcleo y su enlace al ADN, evidenciando el deterioro de la membrana celular. Otra observación interesante resulta de la disminución del número de

células presentes por campo en el cultivo, el cual se observa significativamente menor en el cultivo tratado con la combinación Nanopartículas/anticuerpo (tabla de contingencia, Ji-cuadrado, df: 63,52, 1 con valor de  $p < 0,05$ ) al ser comparado con cualquiera de las otras condiciones.

En la figura 5 se observa la cuantificación de la intensidad de la señal de fluorescencia verde registrada en citoplasma celular en los diferentes tratamientos, luego de la tinción vital con bromuro de etidio y naranja de acridina. El análisis estadístico de estos valores (Tablas de contingencia) arrojó una correlación significativa entre una baja intensidad de fluorescencia verde en el citosol (menor al promedio del control menos una desviación estándar; Ji-cuadrado, df: 60,62, 1 con valor de  $p < 0,05$ ) y el tratamiento conjunto del anticuerpo y la nanopartícula. De esta manera se corrobora que el citoplasma en todas las células tratadas con nanopartículas mantiene un pH neutro similar al observado en el tratamiento con el anticuerpo solo o en las células sin tratar. Sin embargo, al combinar ambos tratamientos, los valores de pH citoplasmático disminuyeron de manera significativa, es decir, el citoplasma se hace más ácido.



**Figura 4.** Micrografías de células SKBR3 tratadas con trastuzumab-FITC y/o nanopartículas de ferrita de cobalto y azul de prusia, teñidas con Naranja de acridina y Bromuro de Etidio (5 mg/mL). Panel **A**: células sin tratamiento. Panel **B**: células tratadas con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia (10 µg/ml). Panel **C**: células tratadas con Trastuzumab-FITC (10 µg/ml). Panel **D**: células tratadas con Trastuzumab-FITC previamente mezclado con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia (ambos a 10 µg/ml).

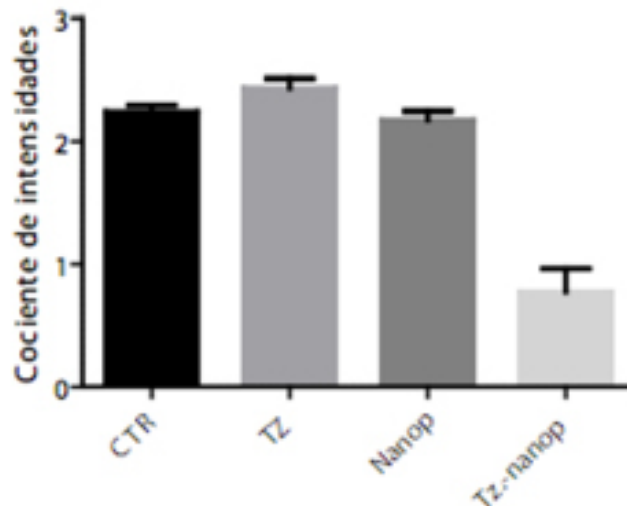


**Figura 5.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia registrada en la Fig. 4, **CTR**: células control sin tratamiento. **TZ**: células tratadas con Trastuzumab–FITC a 10 µg/ml. **NanoP**: células tratadas con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia a 10 µg/ml. **TZ/NanoP**: células tratadas conjuntamente con Trastuzumab–FITC y nanopartículas a 10 µg/ml. Se destaca en números rojos el valor del punto de corte usado para los análisis estadísticos por tablas de contingencia.

Este mismo análisis estadístico (Tablas de contingencia) empleando los valores de intensidad de fluorescencia en rojo, no mostró correlación alguna entre la intensidad obtenida en los diferentes tratamientos (Ji-cuadrado df: 0,2211,1 con valor de  $p > 0,05$ ) (datos no mostrados).

Con el fin de registrar de forma más integral el fenómeno observado en el citoplasma celular, se realizó un cociente entre las intensidades de verde y rojo observadas (Figura 6). En los tres primeros casos (CTR, TZ y Nanop), la relación entre la coloración verde y la roja del citoplasma se mantuvo

cercana a 2. En cambio, bajo el tratamiento con las nanopartículas y el anticuerpo combinados (Tz-nanop), este cociente se redujo significativamente a menos de la mitad. Según el análisis estadístico, (Tablas de contingencia) existe una correlación entre los cocientes de intensidad de fluorescencia obtenidos y los diferentes tratamientos, siendo el tratamiento combinado (Tz-nanop) (Ji-cuadrado, df: 63,52,1 con valor de  $p < 0,05$ ) el que presenta el menor cociente con respecto a las otras tres condiciones.



**Figura 6.** Cociente entre las intensidades de fluorescencia verde y roja registradas en la Fig. 4, **CTR**: células control sin tratamiento. **TZ**: células tratadas con Trastuzumab–FITC a 10 µg/ml. **NanoP**: células tratadas con nanopartículas de ferrita de cobalto acoplada a azul de Prusia a 10 µg/ml. **TZ/NanoP**: células tratadas conjuntamente con Trastuzumab–FITC y nanopartículas a 10 µg/ml.

## DISCUSION

La toxicidad de las NPs para los humanos y el ambiente resultade absoluta prioridad en nanomedicina. En este sentido, los cultivos celulares son importantes como herramienta de primera línea para evaluar la eficacia terapéutica y la seguridad de los medicamentos y de esta manera proporcionar información esencial para comprender las interacciones célula-nanopartículas, antes de pasar al análisis *in vivo* (Luengo, Nardecchia, Morales, & Serrano, 2013) many questions still arise concerning the biocompatible nature of NPs when in contact with biological systems. Herein, we have investigated how controlled changes in the physicochemical properties of iron oxide NPs at their surface (i.e., surface charge and hydrodynamic size).

La modificación de nanopartículas con compuestos biológicamente activos permite el transporte de agentes terapéuticos a células diana específicas, aumentando la especificidad y evitando el acceso de agentes citotóxicos a los tejidos que no son objetivo durante el proceso de suministro (Sajja et al., 2009). La orientación activa aprovecha la expresión aumentada de diferentes epítomos o receptores en las células tumorales y/o en características físicas específicas, por lo que los anticuerpos representan uno de los bioconjugados más interesantes para lograr la entrega dirigida activa de un portador terapéutico (Manuel Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007). La combinación con anticuerpos aprovecha entonces las propiedades de las NPs y la capacidad selectiva de los anticuerpos para antígenos específicos, mejorando la captación celular y brindando mayor estabilidad intracelular (M Arruebo, Valladares, & Gonzalez-Fernandez, 2009).

A pesar de que en nuestros ensayos no fue posible corroborar el acoplamiento entre las nanopartículas magnéticas empleadas y el anticuerpo trastuzumab mediante la visualización con el microscopio de epi-fluorescencia disponible, la combinación física entre éstos parece haber sido exitosa. Esto se demuestra al comparar los resultados del tratamiento combinado con los de aquellos en los que se aplicó las nanopartículas o el anticuerpo de forma independiente, ya que en estos últimos no se observaron cambios tan notorios sobre los niveles de fluorescencia o el número de células SKBR-3 vivas en el cultivo. Por lo tanto, es posible que interacciones de tipo no-covalente resulten lo suficientemente fuertes como para que se cree una unión estable (Bertolini, Shaked, Mancuso, & Kerbel,

2006). Según Yu y col. (2012), este tipo de uniones pueden ser bastantes estables y son capaces de generar cambios significativos en la fluorescencia observada en las membranas de células tratadas de forma similar a la aquí descrita. De hecho, la combinación de la nanopartícula magnética de ferrita de cobalto y azul de prusia con el anticuerpo trastuzumab favoreció la ubicación una mayor cantidad del anticuerpo sobre a la membrana, reflejado en un aumento de la fluorescencia superficial (Yu, Park, y Jon 2012).

El aumento de la unión de un anticuerpo dirigido contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico en presencia de nanopartículas magnéticas ha sido descrito en estudios previos. Hathaway y colaboradores conjugaron nanopartículas de óxido de hierro a un anticuerpo anti-HER2, demostrando un aumento dependiente de la concentración del antígeno y del tiempo, en líneas celulares de cáncer de mama (Hathaway et al., 2011). Adicionalmente, se ha confirmado experimentalmente la interacción entre NPs en suspensión y membranas lipídicas (- Drašler et al., 2014). En aplicaciones biomédicas, la localización de nanopartículas en las membranas permitiría la identificación de los grupos celulares o el marcaje de tejidos, bien sea para estudios por imagen o para la realización de cirugía guiada por imágenes (Karakatsanis et al., 2016)  $p = 0.76$ . Cuando estas nanopartículas se encuentran biofuncionalizadas con moléculas como los anticuerpos, pueden dirigirse más eficientemente a tejidos blanco con base en la sobre-expresión de proteínas específicas, tales como HER2.

El análisis *in vitro* empleando una mezcla de Naranja de Acridina (OA) y Bromuro de Etidio (BrEt) permite la detección simultánea de varios fenómenos biológicos en un mismo análisis. Por una parte, puede registrarse la viabilidad celular mediante el monitoreo de la integridad de la membrana plasmática por exclusión del BrEt. Por otro, puede observarse el efecto del tratamiento sobre el mecanismo de muerte celular y la participación de procesos lisosomales sobre el mismo. Este abordaje ha sido utilizado en la evaluación del efecto citotóxico de varias nanopartículas (Nogueira, Mitjans, Rolim, & Vinardell, 2014).

Nuestros resultados muestran que, a las concentraciones y tiempos empleados, las células tratadas con Trastuzumab-FITC o nanopartícula de manera independiente no presentan un comportamiento significativamente citotóxico al ser comparados con el control sin tratamiento en ensayo de

permeabilidad al bromuro de etidio. En cambio, el tratamiento combinado de nanopartículas con anticuerpo muestra un menor número de células adheridas, algunas de las cuales presentan características que sugieren que hubo una permeabilización de la membrana plasmática y/o lisosomal, observándose rojas en el núcleo y el citoplasma. Estos resultados sugieren que la combinación de la nanopartícula con el anticuerpo puede tener un efecto sinérgico que afecta la supervivencia celular. Tseng *et al* (2015) crearon una nanopartícula y la conjugaron covalentemente al anticuerpo Cetuximab, un anticuerpo dirigido al receptor de factor epidérmico humano (EGFR) que es sobreexpresado en algunos tipos celulares de cáncer de mama, páncreas y pulmón. En dicha investigación también encontraron que el tratamiento de células tumorales con las nanopartículas conjugadas al anticuerpo Cetuximab aumenta la muerte celular y preservando además la capacidad del sistema inmunitario de reconocerlas a través del anticuerpo.

La naranja de acridina es un compuesto permeable a la célula, el cual se concentra dentro de los lisosomas, dándoles un color naranja que es dependiente del pH ácido característico de esta organela. Cuanto más alta sea la concentración de la naranja de acridina dentro del lisosoma (lo cual depende de su acidez), mayor será su intensidad de fluorescencia roja. En el citoplasma, donde el pH es normalmente neutro y en consecuencia la concentración de naranja de acridina es baja, se observa normalmente una fluorescencia verde. Con estas simples características es posible evaluar la activación lisosomal de las células tumorales tratadas, ya que cualquier cambio en la intensidad de la fluorescencia representa ya sea una activación lisosomal, una acidificación del citoplasma o ambas (Boya P, 2008).

En el caso particular del tratamiento conjunto de nanopartícula y anticuerpo, el incremento de la muerte celular se presenta en un contexto en el que la concentración de anticuerpo sobre la membrana se ve significativamente aumentada por la presencia de la nanopartícula y las células sobrevivientes presentan modificaciones citoplasmáticas que sugieren la afectación de la función del lisosoma. La disminución del pH citoplasmático sugiere que enzimas hidrolíticas provenientes del lisosoma hayan podido permearse hacia el citoplasma, afectando la neutralidad del pH.

Este tipo de fenómeno ya ha sido descrito en células tumorales tratadas con ciertos detergentes, con enzimas contenidas en los gránulos de células citotóxicas y otras moléculas capaces de inducir la permeabilización de la membrana lisosomal (Martins *et al.*, 2015) (Zhang, Zhong, Shi, Guo, & Fan, 2009). La relación entre estos dos fenómenos, *i.e.* una mayor cantidad de anticuerpo sobre la superficie celular y la disminución del pH citoplasmático, no ha sido establecida pero no pareciera depender de la internalización prematura del anticuerpo, ya que a los tiempos estudiados no se observó mayor cantidad de anticuerpo fluorescente dentro del citosol.

Finalmente, muchos de los estudios realizados con nanopartículas hasta la fecha también incluyen ensayos en modelos animales que demuestran su localización dentro del tumor y su toxicidad, por lo que se sugiere la realización de este tipo de ensayos con las nanopartículas magnéticas conjugadas a trastuzumab para la evaluación de su potencial terapéutico real.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with imageJ. *Biophotonics International*. <https://doi.org/10.1117/1.3589100>
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70084-1](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70084-1)
- Arruebo, M., Valladares, M., & Gonzalez-Fernandez, A. (2009). Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2009/439389>
- Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P., & Kerbel, R. S. (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification, *6*(November), 835–845. <https://doi.org/10.1038/nrc1971>
- Boya P, K. G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*.
- Creixell, M., Bohórquez, A. C., Torres-Lugo, M., & Rinaldi, C. (2011). EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/nn201822b>
- Drašler, B., Drobne, D., Novak, S., Valant, J., Boljite, S., Otrin, L., Zupanc, J. (2014). Effects of magnetic cobalt ferrite nanoparticles on biological and



- artificial lipid membranes. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57671>
- Fan, C., Gao, W., Chen, Z., Fan, H., Li, M., Deng, F., & Chen, Z. (2011). Tumor selectivity of stealth multi-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.038>
- Hathaway, H. J., Butler, K. S., Adolphi, N. L., Lovato, D. M., Belfon, R., Fegan, D., ... Flynn, E. R. (2011). Detection of breast cancer cells using targeted magnetic nanoparticles and ultra-sensitive magnetic field sensors. *Breast Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/bcr3050>
- Karakatsanis, A., Christiansen, P. M., Fischer, L., Hedin, C., Pistoli, L., Sund, M., Bergkvist, L. (2016). The Nordic SentiMag trial: a comparison of superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles versus Tc99 and patent blue in the detection of sentinel node (SN) in patients with breast cancer and a meta-analysis of earlier studies. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3809-9>
- Luengo, Y., Nardecchia, S., Morales, M. P., & Serano, M. C. (2013). Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/c3nr02148c>
- Martins, W. K., Costa, É. T., Cruz, M. C., Stolf, B. S., Miotto, R., Cordeiro, R. M., & Baptista, M. S. (2015). Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep12425>
- Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R., & Allemann, E. (2004). Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.20098>
- Nogueira, R. D., Mitjans, M., Rolim, M. C., & Vinarcell, P. M. (2014). Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies. *Nanomaterials*. <https://doi.org/10.3390/nano4020454>
- Sajja, H. K., East, M. P., Mao, H., Wang, Y. A., Nie, S., & Yang, L. (2009). Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and noninvasive imaging of therapeutic effect. *Current Drug Discovery Technologies*. <https://doi.org/10.2174/157016309787581066>
- Tseng et al (2015), Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. PubMed: 15922010 Full text @ Toxicol. Appl. Pharmacol.
- Yu, M. K., Park, J., & Jon, S. (2012). THERANOSTICS. *Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy*.
- Zhang, H., Zhong, C., Shi, L., Guo, Y., & Fan, Z. (2009). Granulysin Induces Cathepsin B Release from Lysosomes of Target Tumor Cells to Attack Mitochondria through Processing of Bid Leading to Necroptosis. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6993 LP-7000. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/182/11/6993.abstract>.