

NANOPARTÍCULAS DE LIGNINAS COMO CARRIERS PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ONCOLÓGICOS ACTIVADA POR NEUTRÓFILOS

Florencia Fagiano¹, Alexis Wolfel², Cecilia I. Alvarez Igarzabal², Luis M. Gugliotta³, Verónica Nicolau^{1*}, Julio C. Cuggino^{1,3*}

Afiliación de los autores:

- 1) Grupo de Polímeros (Gpol), Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional San Francisco, Universidad Tecnológica Nacional, Avda. de la universidad 501, San Francisco (2400), Córdoba, Argentina.
- 2) IPQA-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende. Ciudad Universitaria. Córdoba (X5000HUA). Argentina
- 3) Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), CONICET-UNL. Güemes 3450. Santa Fe (3000) Argentina.

Mail de contacto: vnicolau@sanfrancisco.utn.edu.ar / juliocuggino@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la quimioterapia convencional para el tratamiento del cáncer está basada en tratamientos sistémicos, donde la administración intravenosa de fármacos muy tóxicos genera efectos adversos sobre los pacientes, ya que actúan tanto en células tumorales como en células normales.

Para tratar de disminuir los efectos negativos que esto genera, aparece la nanomedicina aplicada al cáncer, brindando nuevas tecnologías para un tratamiento más efectivo y seguro (Shi et al., 2017). Una alternativa es la encapsulación de fármacos en nanopartículas.

En esta tecnología, se produce una administración sistémica por vía intravenosa de nanopartículas (NPs) cargadas con fármacos oncológicos para el transporte sistémico a los tumores. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos a los tumores son más permeables que los tejidos normales. Esto está dado por el efecto de retención y permeabilidad aumentada (*EPR Effect*: Enhanced Permeability and Retention Effect). Esto facilita que las NPs cargadas con medicamentos se acumulen en los sitios tumorales, pasando del sistema sanguíneo al sitio tumoral. De esta manera, aumenta la eficacia terapéutica en comparación con la administración de medicamentos libres. Este suministro pasivo de fármacos depende en gran medida del tamaño de las NPs, que según investigaciones su valor óptimo para esta aplicación se encuentra entre los 5 y 200 nm.

La lignina es el segundo polímero más abundante de la biomasa después de la celulosa. La biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, estabilidad a pH fisiológico y estabilidad térmica son las propiedades que favorecen su aplicación en el área biomédica (Figueiredo et al., 2017).

Así, en este trabajo se propone la preparación de NPs de lignina (NPs LG) para su utilización como carriers de Paclitaxel. Las nanoformulaciones después de una administración intravenosa se acumularían en sitios tumorales por EPR effect. Una vez allí y debido a la gran presencia de neutrófilos en los sitios tumorales (los neutrófilos se acumulan en sitios de inflamación), las nanoformulaciones podrían ingresar a los neutrófilos vía endocitosis y activar la liberación del fármaco, debido a la degradación de las nanoformulaciones mediada por la enzima mieloperoxidasa (MPO), que está presente en los neutrófilos. El fármaco luego podría ingresar a células tumorales por difusión y matar las células cancerígenas.

MÉTODOS

Los siguientes productos químicos se utilizaron como se compraron: Indulin AT Lignin (LG, Ingevity); Dimetilformamida (DMF, Anedra); Ácido cítrico (CA, Aldrich); Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Aldrich); N-hidroxisuccinimida (NHS, Aldrich); Paclitaxel (PTX, Aldrich); Dimetilsulfóxido (DMSO, Anedra). Para preparar las nanopartículas, se disolvió lignina Indulin AT en DMF. Luego, la solución se transfirió a una membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) de 50 kDa y se sumergió en un vaso de precipitados de 2 L con agua destilada. El proceso completo para formar las nanopartículas se llevó a cabo durante 8 horas con un reemplazo de agua una vez a las 4 h. El tamaño de las NPs fue determinado por DLS en un instrumento Malvern Z-Sizer. Una vez que se formaron las NPs y se corroboró el tamaño, se llevó a cabo una reacción de entrecruzamiento que involucra la reacción entre los grupos hidroxilo de LG y los grupos ácidos del ácido cítrico previamente activados con NHS (N-hidroxisuccinimida) y EDC(1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida). En un procedimiento típico de entrecruzamiento, los primeros 60 mg de NPs en dispersión (2 mg mL⁻¹) se colocaron en un balón con tapón de goma. Luego, el ácido cítrico, EDC y NHS se pesaron y luego se disolvieron en 1 mL de la dispersión anterior de LG NPs (2 mg mL⁻¹) y se agregaron inmediatamente a la dispersión total de LG NPs que se precalentó a 60 ° C. La reacción tuvo lugar durante 1 hora a 60°C. De acuerdo con el porcentaje teórico de los grupos hidroxilo que participan de la reacción de entrecruzamiento, las NPs fueron nombrados como: NPs LG10 o NPs LG20. Después de enfriar la reacción, las NPs de LG se purificaron mediante diálisis contra agua destilada (2 L) usando una membrana de MWCO de 50 KDa. El agua se cambió cuatro veces cada 8-12 h. El tamaño de las NPs en dispersión se midió utilizando un Zetasizer® Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido) en diferentes medios de hinchamiento. Por lo tanto, las NPs antes del entrecruzamiento se midieron como se obtuvieron, en agua y a 25 ° C por triplicado. Por otro lado, las NPs luego del entrecruzamiento y la purificación se midieron en medios que simulaban las condiciones ambientales en plasma (buffer de solución salina fosfato PBS pH = 7,4) y en el entorno lisosomal (buffer de solución salina ABS pH = 5). Ambas determinaciones se realizaron a 37 ° C por triplicado. La morfología de las NPs se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio Zeiss Sigma. La carga de Paclitaxel se realizó mediante la disolución de 3 mg Paclitaxel en 4 ml de DMSO, que se añadieron a 30 mg de lignina bajo agitación. El proceso completo de la carga de droga se llevó a cabo durante 24 horas bajo agitación continua.

RESULTADOS

La formación de nanopartículas se realizó mediante el proceso de nucleación basado en diálisis utilizando un no solvente para formar las NPs por agregación. Las NPs de lignina obtenidas fueron estabilizadas mediante la reacción de entrecruzamiento. La misma se realizó para lograr una unión química fuerte para evitar que las NPs se desagreguen en la sangre. Este proceso está representado en la Fig. 1.



Fig. 1. Formación de NPs de Lignina y reacción de entrecruzamiento

Los resultados del DLS indican los tamaños de las NPs de lignina. En la Fig. 2. se muestran los resultados obtenidos en las muestras de NPs LG10. El tamaño en dispersión fue de 54.0 nm. Los resultados obtenidos para todas las muestras de NPs indican que los tamaños se encuentran

dentro de los límites definidos para la aplicación de nanopartículas en nanomedicina.

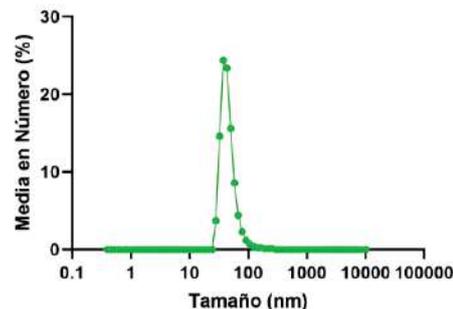


Fig. 2. Distribución de tamaños de NPs LG10

Los resultados obtenidos del SEM para las NPs LG10 que se muestran en la Fig. 3., permiten identificar que la morfología de las NPs es esférica y que las NPs poseen un tamaño aproximado en estado seco de 40-50 nm lo cual corrobora las mediciones por DLS.

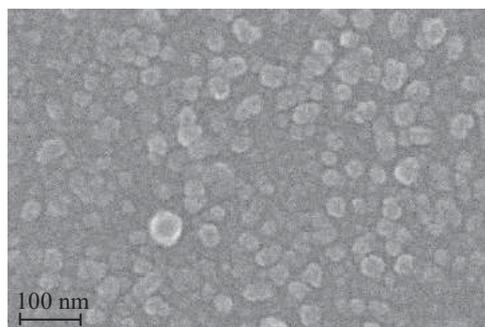


Fig. 3. Imagen obtenida por SEM para NPs LG10

La carga de Paclitaxel en las NPs fue eficiente a simple vista, ya que no se observó una precipitación del fármaco luego de exponerlo a un ambiente acuoso.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró realizar la preparación de NPs con un tamaño adecuado para su aplicación como carrier en terapias del cáncer. Se pudieron verificar los tamaños de las NPs entrecruzadas y sin entrecruzar con técnicas de DLS y SEM. Además, se pudo realizar la carga de las NPs LG10 y NPs LG20 con Paclitaxel. Se espera poder ensayar las nanoformulaciones en modelos celulares tumorales.

REFERENCIAS

- Figueiredo, P. [et al] "In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells". *Biomaterials*, 121, 97-108 (2017).
- Shi, J. [et al] "Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities". *Nature Reviews Cancer*. 17, 20-37 (2017).