

Estudio *in vitro* de la degradación de DNA de nanobiocatalizadores de Cu/TiO₂ utilizados en Biomedicina

González García Samuel¹, Bustos Martínez Jaime Amadeo¹, Hamdan Partida Aída¹
Ortiz Islas Emma Elisa², López Goerne Tessy María^{1, 2}

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Atención a la Salud
Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán. México, D.F. CP 04960.

²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".
Av. Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, Del. Tlalpan. México, D.F. CP 14269.

samuel2023@hotmail.com

Fecha de aceptación: 10 de Agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de Septiembre de 2015

RESUMEN

En la actualidad existen múltiples tratamientos contra el cáncer, entre los que se encuentran los fármacos alquilantes como el cisplatino. Sin embargo, las investigaciones actualmente se enfocan en la búsqueda de nuevos tratamientos con compuestos menos dañinos para el paciente. En el presente trabajo se sintetizaron materiales nanoestructurados de Cu/TiO₂ los cuales son más efectivos que los fármacos convencionales en el tratamiento del cáncer, ya que se obtienen nanopartículas entre 5 y 10 nm, las cuales son capaces cruzar las diferentes barreras celulares y llegar a su DNA destruyéndolo. Se usaron diferentes precursores de Cobre para preparar los nanobiocatalizadores para optimizar el mejor quimioterápico. Todos degradan el DNA pero a diferente velocidad, tienen un diámetro de poro de 1 a 20 nm y se presenta la cinética de degradación en función del tiempo, siendo el CuCl₂ el más rápido seguido del Cu(NH₄)₂Cl₄.

Palabras clave: nanobiocatalizadores Cobre/titania, DNA.

ABSTRACT

At present there are many treatments for cancer, including alkylating agents such as cisplatin are. However, research now focuses on finding new treatments with less harmful compounds to the patient. In this paper nanostructured materials Cu/TiO₂ which are more effective than conventional drugs in the treatment of cancer, since nanoparticles are obtained between 5 and 10 nm were synthesized, which are able to cross the different cell barriers and destroying their DNA. Different copper precursors used to prepare the nanobiocatalizadores to optimize the best chemotherapeutic. All degrade DNA but at different rates, have a pore diameter of 1 to 20 nm and the degradation kinetics occurs fastest in CuCl₂ and followed by Cu(NH₄)₂Cl₄.

Key words: nanobiocatalizadores copper/titania, DNA.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años con la aplicación de la nanotecnología ha habido un rápido desarrollo en la industria y la medicina, debido a que los nanomateriales poseen distintas propiedades funcionales, además que están acondicionados para dirigirse a blancos terapéuticos específicos (Maqsood *et al.*, 2014).

El cáncer constituye más de 100 tipos de enfermedades con diferente epidemiología y factores de riesgo (Stratton *et al.*, 2009). En México en 2013, el cáncer fue la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128,000 casos nuevos (SSA; 2013). Actualmente el papel del DNA en el control de las funciones vitales celulares se convierte en una excelente diana para el tratamiento contra el cáncer, siendo una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad (López T *et al.*, 2013).

La FDA ha aprobado el uso de diversos medicamentos nanoparticulados para el cáncer entre ellos el Abraxane® (paclitaxel) (Ping y Rusell, 2013), Doxil® (doxorubicin) entre otros, además de estar en etapas clínicas y subclínicas otros principios activos usando la nanotecnología (Engelberth *et al.*, 2014). En México se ha desarrollado una nueva forma de tratar el cáncer usando nanobiocatalizadores Sol-gel (López *et al.*, 2008., López *et al.*, 2010 y López *et al.*, 2013) cogelados con diversos complejos metálicos de platino y Cobre al mismo tiempo que la titania.

Estudios reportan que nanopartículas con complejos de diferentes metales, entre ellos el Cobre II (Cu II) son capaces de degradar el DNA afectando las funciones vitales de las células cancerosas (López T *et al.*, 2010). En este trabajo se realizó un estudio *in vitro* de la degradación de DNA con diversas nanopartículas de titania dopadas con varios precursores de Cobre a diferentes concentraciones.

METODOLOGÍA

Espectroscopia de UV-Vis de líquidos

Se realizaron suspensiones de 5, 10 y 20 mg de las nanopartículas y precursores de Cobre en 25 mL de etanol y agua destilada, se dejaron reposar por 15 minutos, se filtraron 3 mL de la suspensión con membranas de polipropileno de 0.22 μm y se realizó un escaneo de 200 a 800 nm en el espectrofotómetro 2008 SA13 (Scinco® Co.LTD) y el espectrofotómetro DU730 (BeckmanCoulter®) utilizando celdas de cuarzo de oscuras (Beckman Coulter®) de 1 cm y como blanco etanol absoluto o agua destilada, los datos obtenidos se analizaron con el software Lab Pro Plus®.

Análisis de fisisorción de nitrógeno (BET)

Se pesaron entre 200 y 400 mg de solamente las nanopartículas y TiO₂ en celdas del equipo de desgasificación con filtro para el pretratamiento de la muestra en las siguientes condiciones: 50° C a alto vacío por 48 horas. Se colocó N₂ líquido en el aparato y las celdas en los puertos del equipo BET PREP II® Vac y BEL SORP II mini® (BEL Japan®.inc) de fisisorción de nitrógeno. Se colocaron los parámetros en el software BelSorp Mini® con las siguientes condiciones de corrida temperatura de 77 K con presión relativa de 0.01-0.99 P/P_o. Los datos se tratan con el software BEL MASTER®.

Extracción de DNA

Se tomaron muestras de sangre periférica a 2 adultos sanos en tubos con EDTA, la extracción de DNA se realizó con el Kit Wizard® Genomic DNA Extraction (Promega®) siguiendo las especificaciones del proveedor, para la cuantificación de DNA se utilizó un biofotómetro de la marca Eppendorf, haciendo soluciones con 5 μL de DNA y 45 μL de agua libre de nucleasas, leyéndolo a 260 y 280 nm y haciendo la corrección por dilución. Para determinar la integridad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% añadiendo 5 μL de DNA y 1 μL de buffer de carga 6X a 120 V por 60 minutos, pasado ese tiempo, el gel se colocó en bromuro de etidio por 15 minutos y se reveló en el transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad®) con el software Quantity-One®.

Degradación de DNA in vitro

Se realizaron suspensiones de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de nanopartículas y titania en agua libre de nucleasas, se tomaron 20 μL de esta suspensión y se le añadieron a 20 μL de DNA a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se tomaron 2 μL de esta suspensión a los 0, 20, 40, 60, 180, 480 y 1440 minutos, a cada tiempo se realizó un gel de agarosa al 1% con las siguientes condiciones de corrida: 120 V por 60 minutos, después de este tiempo, el gel se tiñó en bromuro de etidio por 15 minutos y se reveló en el transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad®) con el Software Quantity-One®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectroscopia de UV-Vis

Se encontró el pico característico del TiO_2 en 380 nm al igual que la transición común del átomo de Cobre entre 280 y 290 nm para cada nanopartícula, además que se conservan los picos de absorción de los precursores en todas las concentraciones de las nanoestructuras (Figura 1 y Figura 2).

Análisis de fisisorción de nitrógeno (BET)

El tamaño de poro de las nanopartículas dopadas aumenta solo en la nanopartícula de CuCl_2 al 10%, en las demás disminuye a un tamaño entre 2 y 5 nm (Tabla 1), además los isotermas de adsorción muestran que los nanocompuestos entran en la clasificación IV asociada a materiales mesoporosos.

Extracción y degradación de DNA in vitro

La degradación de DNA (Figura 3) se empieza a observar desde los 15 minutos de incubación con las nanopartículas de CuCl_2 en los 3 porcentajes utilizados (Fig. 3 carriles 8, 9 y 10), degradando completamente el DNA a los 180 minutos. Las nanoestructuras de $\text{Cu}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_4$ (Fig. 3 carriles 2, 3 y 4) comienzan a degradar el DNA a partir de los 30 minutos de iniciada la reacción y finaliza a los 540 minutos. Por otro lado, las nanopartículas de $\text{Cu}(\text{Oac})_2$ (Fig. 3 carriles 5, 6 y 7) y $\text{Cu}(\text{acac})_2$ (Fig. 3 carriles 11, 12 y 13) degradan el DNA a partir de los 180 minutos y finalizan a los 720 minutos. La única nanoestructura que no degradó el DNA después de los 1440 minutos de tratamiento fue la nanopartícula de $\text{Cu}(\text{acac})_2/\text{TiO}_2$ al 5% (Fig. 3 carril 12), sin embargo después de 48 horas del inicio del tratamiento ya había degradado todo el DNA. El control de DNA permaneció íntegro durante todo el tratamiento (Fig. 3 carril 1), el control de TiO_2 tampoco degradó el material genético durante las 24 horas del proceso (Fig. 3 carril 14), mientras que el *cis*-Pt lo degradó por completo a los 360 minutos (Fig. 3 carril 15). Lakshmipraba *et al.*, en 2013 reportan pruebas con polímeros de complejos de Cobre con una disminución de la intensidad de fluorescencia en DNA y RNA a diferentes tiempos de tratamiento. Por otro lado López *et al.*, en 2010 publicaron pruebas de nanopartículas de TiO_2 y SiO_2 con complejos de ácido cloroplátnico (H_2PtCl_6) en donde los complejos empezaron a degradar el DNA a partir de los 30 min y a los 3600 min ya se había degradado el DNA. La variación de los resultados puede deberse a que se utilizaron suspensiones saturadas de nanopartículas de 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mientras que en esta investigación se utilizaron concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, además que la concentración de DNA fue menor (1.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Tabla 1. Datos BET de las nanopartículas con complejo de Cobre a las diferentes concentraciones 2.5, 5 y 10 % comparadas con TiO₂ REF

Muestra	Área BET (m ² g ⁻¹) ¹⁾	Volumen del poro V _m (cm ³ (stp)g ⁻¹)	Promedio del diámetro del poro (nm)
Cu(NH ₄) ₂ Cl ₄ /TiO ₂ 2.5%	563	129	2
Cu(NH ₄) ₂ Cl ₄ /TiO ₂ 5%	220	50	3
Cu(NH ₄) ₂ Cl ₄ /TiO ₂ 10%	148	34	5
Cu(Oac) ₂ /TiO ₂ 2.5%	433	99	3
Cu(Oac) ₂ /TiO ₂ 5%	468	107	2
Cu(Oac) ₂ /TiO ₂ 10%	551	126	2
CuCl ₂ /TiO ₂ 2.5%	378	87	3
CuCl ₂ /TiO ₂ 5%	327	75	5
CuCl ₂ /TiO ₂ 10%	212	49	6
Cu(acac) ₂ /TiO ₂ 2.5%	426	98	2
Cu(acac) ₂ /TiO ₂ 5%	294	69	3
Cu(acac) ₂ /TiO ₂ 10%	460	106	3
TiO ₂	303	69	6

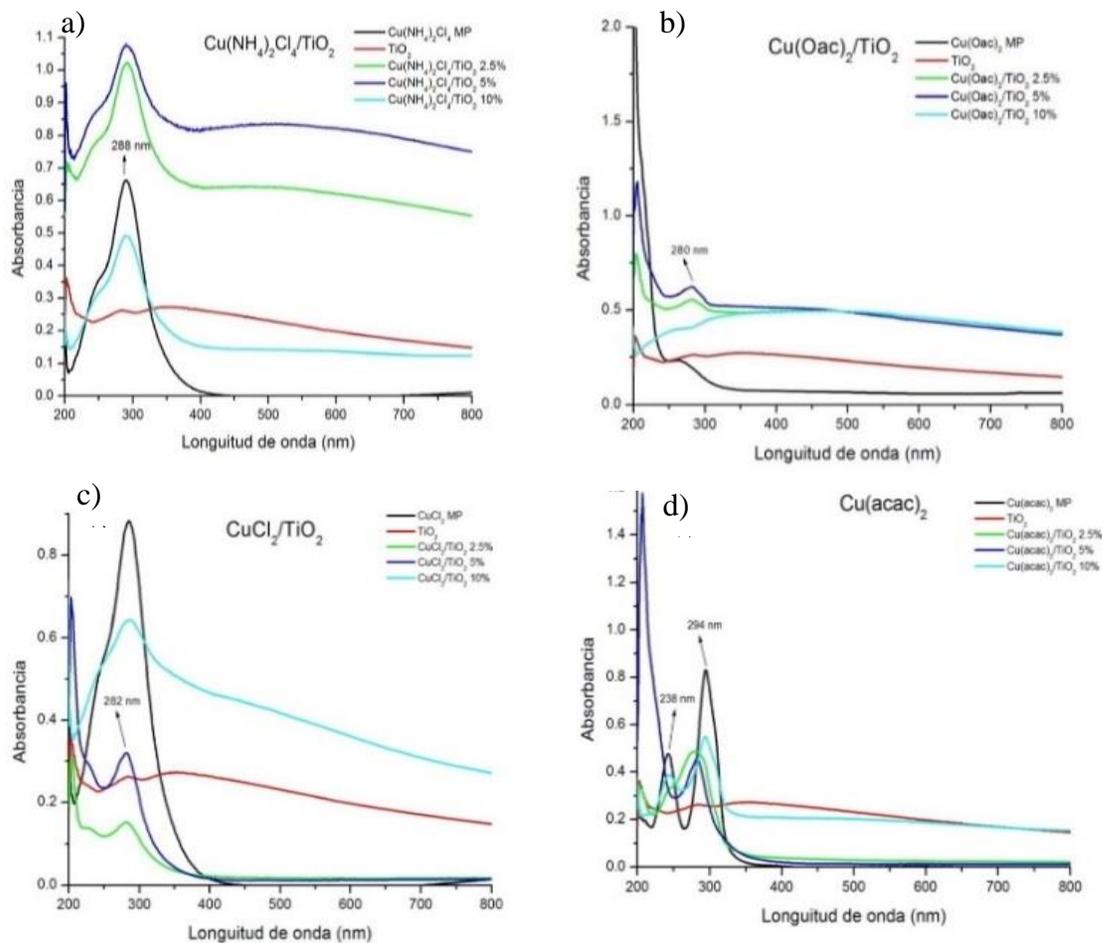


Figura 1. Espectros de UV-Vis de líquidos de las nanopartículas dopadas con complejos de Cobre usando como medio etanol. a) Cu(NH₄)₂Cl₄/TiO₂, b) CuCl₂/TiO₂, c) Cu(Oac)₂/TiO₂ y d) Cu(acac)₂/TiO₂ al 2.5, 5 y 10 % comparadas con TiO₂ MP y materia prima de cada compuesto de Cobre.

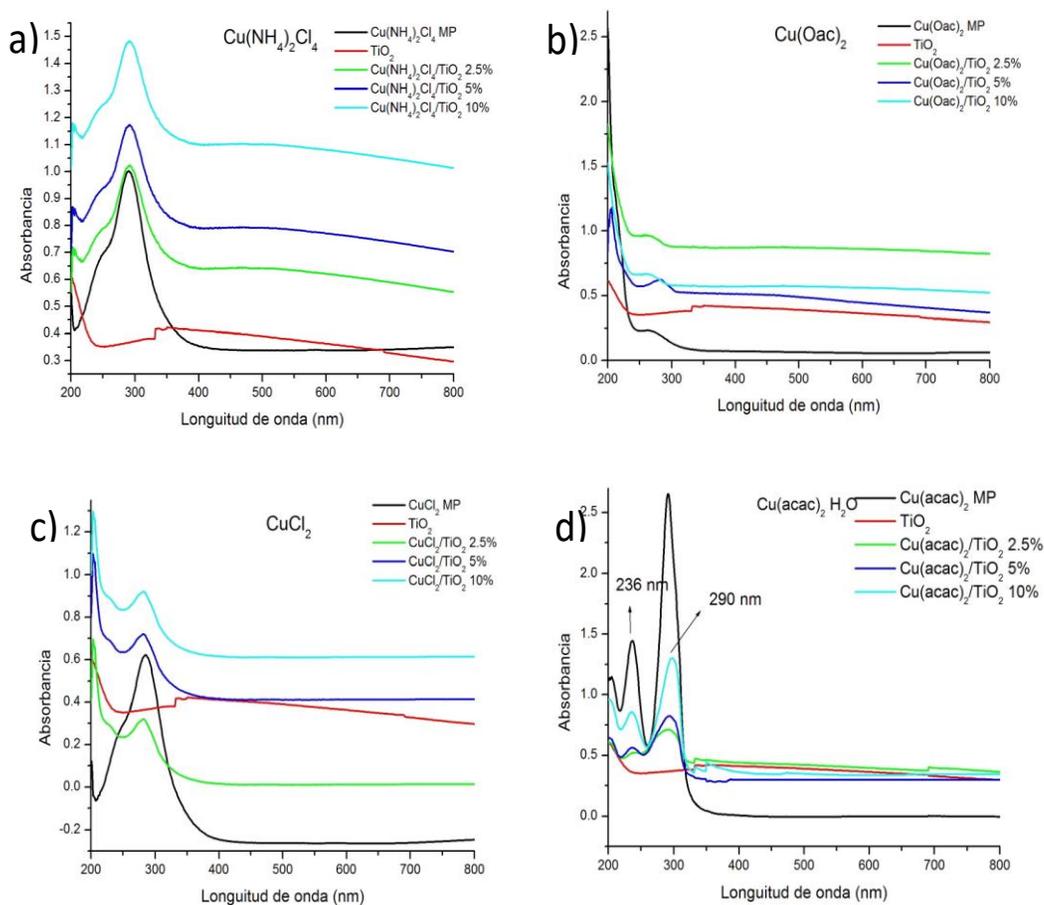


Figura 2. Espectros de UV-Vis de las nanopartículas Cobre-TiO₂ usando como medio agua. a) Cu(NH₄)₂Cl₄/TiO₂, b) CuCl₂/TiO₂, c) Cu(Oac)₂/TiO₂ y d) Cu(acac)₂/TiO₂ al 2.5, 5 y 10 % comparadas con TiO₂ MP y materia prima de cada compuesto de Cobre

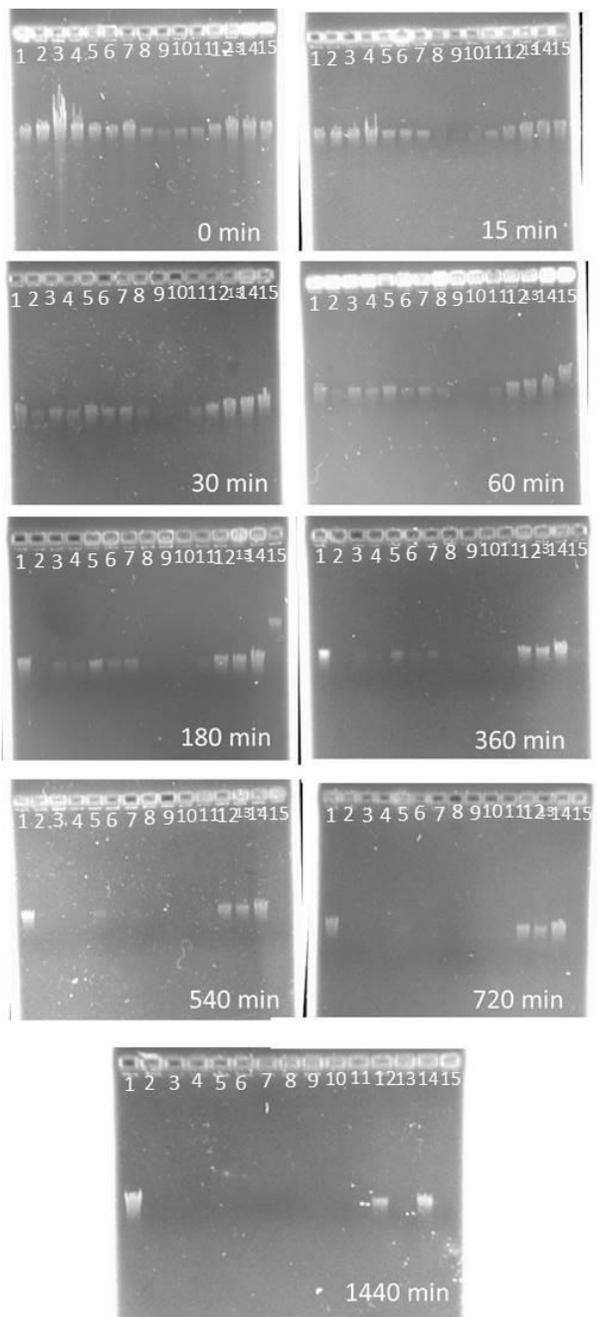


Figura 3. Geles de agarosa al 1% Degradación de DNA con nanopartículas de titania-Cobre. Carril 1: DNA control; carriles 2, 3 y 4: $\text{Cu}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_4/\text{TiO}_2$ al 2.5, 5 y 10% respectivamente; carriles 5, 6 y 7: $\text{Cu}(\text{Oac})_2/\text{TiO}_2$ al 2.5, 5 y 10% respectivamente; carriles 8, 9 y 10: $\text{CuCl}_2/\text{TiO}_2$ al 2.5, 5 y 10% respectivamente; carriles 11, 12 y 13: $\text{Cu}(\text{acac})_2/\text{TiO}_2$ al 2.5, 5 y 10% respectivamente; carril 14: TiO_2 ; carril 15: cis-Pt

CONCLUSIONES

Las nanoestructuras de TiO_2 dopadas con los precursores de Cobre liberan al compuesto de Cobre tanto en medio acuoso como en medio con etanol según lo mostrado en los espectros de UV-Vis, por

otro lado, las nanopartículas analizadas entran en la clasificación IV de isothermas de adsorción/desorción en las cuales el tamaño del poro está entre 1 y 20 nm de diámetro.

Las nanopartículas de $\text{CuCl}_2/\text{TiO}_2$ son las que degradan más rápido el DNA. Seguido de las nanomateriales de $\text{Cu}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_4/\text{TiO}_2$. El cis-Pt degrada el DNA hasta 24 horas después de iniciado el tratamiento, mientras que el TiO_2 y la nanopartícula de $\text{Cu}(\text{acac})_2/\text{TiO}_2$ al 5% no degradaron DNA en el tiempo estudiado.

Por lo que las nanoestructuras de Cu/TiO_2 representan una opción en el tratamiento de células con cáncer.

REFERENCIAS

- Engelberth S., Hempel N y Bergkvist M. (2014). Development of Nanoscale Approaches for Ovarian Cancer Therapeutics and Diagnostics. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 19 (3-4): 281-315.
- Jang J., Orbán M., Wang S y Huh do S. (2014). Adsorption-desorption oscillations of nanoparticles on a honeycomb-patterned pH-responsive hydrogel Surface in a closed reaction system. *PhysChem*. 14, 16(46):25296-305.
- López T., Recillas S., Guevara P., Sotelo J., Alvarez M y Odriozola J A. (2008). Pt/TiO₂ brain biocompatible nanoparticles: GBM treatment using the C6 model in Wistar rats. *Acta Biomat*. (4): 2037-2044.
- López T., Figueras F., Manjarrez J., Bustos J., Álvarez M., Silvestre-Albero J., y Martinez, E. (2010). Catalytic nanomedicine: a new field in antitumor treatment using supported platinum nanoparticles. In vitro DNA degradation and in vivo tests with C6 animal model on Wistar rats. *Europ J of Med Chem*, 45(5), 1982-1990.
- López T., Ortiz-Islas E., Guevara P y Gómez E. (2013). Catalytic nanomedicine technology: copper complexes loaded on titania nanomaterials as cytotoxic agents of cancer cell. *Int J Nanomed*. (8): 581-592.
- López T. (2013). Nanomedicina catalítica: ciencia y cáncer. Arkhé Ediciones. México D. F. pp. 99-200.
- Maqsood A., Quaiser S., Maqsood A., Nida N., Javed A., Rizwan W., Shams T., Hisham A., Javed M., Abdulaziz A., Miller RP., Tadagavadi RK., Ramesh G y Reeves WB. (2010). Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*. 2(11): 2490-4518.
- Ping M y Russell J. (2013). Paclitaxel Nano-Delivery Systems: a Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol*. 4(2): 1000164.
- Secretaria de Salud, Subsecretaria de prevención y promoción de la salud, 2013. Los cinco tipos de cáncer que más afectan a los mexicanos. www.spps.salud.gob.mx/noticias/1495-5-tipos/cancer/mas/afectan/mexicanos.html. Revisado el 02-12-14 a las 16:15.
- Stratton MR., Campbell PJ y Futreal A. (2009) .The cancer genome. *Nature*; 458: 719-724.