EVALUACIÓN DE NANOSISTEMAS LIPOSOMALES COMO AGENTES DE TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO

Nicole Lecot[a], Natalia Oddone[b], Marcelo Fernández[a], Juan Benech[b], Juan Pablo Gambini[c], Pablo Cabral[a]

a) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
b) Laboratorio de Señalización celular y Nanobiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (MEC), Montevideo, Uruguay
c) Medicina Nuclear. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

RESUMEN

La curcumina es una molécula de polifenol natural derivado de la planta Cúrcuma longa que exhibe propiedades anticancerígenas, antifúngicas, antivirales, antioxidativas, antiinflamatorias y antiproliferativas. La curcumina presenta una amplia disponibilidad en el mundo, es segura, de bajo costo y presenta funciones de combate en múltiples tipos de cáncer que justifican su desarrollo como un medicamento para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, diversos estudios básicos y clínicos han dilucidado su limitada eficacia, debido a su baja solubilidad, alta tasa de metabolismo y baja biodisponibilidad. Con el fin de dirigir la curcumina más selectivamente a las formaciones tumorales y de saltar todas las desventajas antes mencionadas, es que se estudiaron diversas estrategias liposomales como "nanocarriers" para la encapsulación de curcumina. Por lo que para potenciar la acción y el "delivery" de curcumina como antineoplásico, se desarrolló un nanosistema de curcumina liposomal. Se evaluó el efecto antitumoral *in vitro* de la curcumina y de la curcumina liposomal en células 4T1 de tumor mamario murino y se realizaron estudios *ex vivo* en un modelo murino de tumor mamario inducido con células 4T1. Los resultados obtenidos han sido muy alentadores, hemos logrado la encapsulación de la curcumina, con una eficiencia de encapsulación del 31%. Se obtuvieron formulaciones liposomales estables, las cuales se pudieron caracterizar, demostrándose que presentaban un tamaño nanométrico (240 nm). Tanto la curcumina como el nanosistema desarrollado, a las concentraciones estudiadas, mostraron ser citotóxicos en células de cáncer de mama murino 4T1. Por lo que el nanosistema desarrollado tiene potencial para el desarrollo de formulaciones liposomales en aplicaciones de "targeting" tumoral para imagenología y tratamiento oncológico.

PALABRAS CLAVE: DIAGNÓSTICO DE CÁNCER
NANOTECNOLOGÍA
NEOPLASIAS DE LA MAMA
SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS

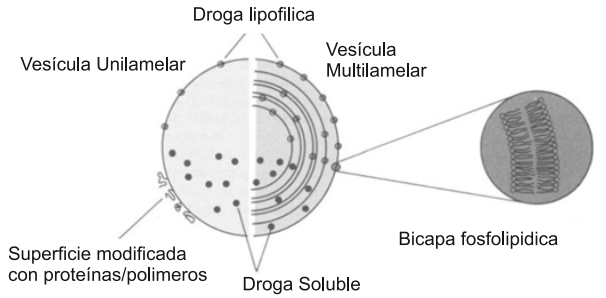
INTRODUCCIÓN

Los liposomas fueron descritos por primera vez a mediados de los 60s por Bangham , el cual describió que ante el exceso de agua, fosfolípidos y otros lípidos anfifílicos polares presentan la capacidad de formar bicapas concéntricas cerradas, logrando el atrapamiento de agua y solutos disueltos (por ejemplo: fármacos o drogas) en el proceso de formación del sistema.

Poco después de su descubrimiento, los liposomas fueron propuestos por Gregoriadis como portadores de fármacos pH sensibles , lo cual sentó las bases para una larga investigación que todavía se encuentra en curso, para desarrollar liposomas como ideales portadores de fármacos (6,7,8,10).

Recibido: Enero 2015
Aceptado: Mayo 2015
Correspondencia: Laboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Mataojo 2055, C.P. 11400, Montevideo, Uruguay.
Tel.: (+598)25250901/108; fax: (+598)25250895. E-mail: pcabral@cin.edu.uy

Dentro de sus principales características, estas nano-partículas son en gran parte esféricas y pueden exhibir una o múltiples bicapas lipídicas concéntricas, logrando varias vesículas más pequeñas dentro de la membrana más externa (esquema 1).



Esquema 1. Representación esquemática de la estructura de un liposoma. La estructura básica de bicapa lipídica forma una barrera de permeabilidad que separa uno o más compartimentos acuosos concéntricos de la fase acuosa exterior. Las drogas pueden ser atrapadas en los compartimentos acuosos o dentro de las bicapas. Las propiedades de superficie pueden ser modificadas por la unión covalente o hidrofóbica de los grupos cargados o poliméricos en la superficie de la bicapa.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Los liposomas fueron sintetizados por el método de Hand Shaken utilizando formulaciones con relación colesterol: fosfatidilcolina (4,9). Para la formación del film se utilizó una solución cloroformo: metanol (2:1 v/v), esta mezcla se evaporó a vacío a 60ºC y 120 rpm y se hidrata con agua para la formación de las vesículas multilamelares de gran tamaño (MLVs). Estas vesículas se extrajeron con filtros de 400nm y después con filtros de 100nm para formar vesículas unilamelares de tamaño pequeño (SUVs).

Cada una de las formulaciones se caracterizaron por coulter (equipo que mide tamaño de partícula por difracción de luz), disponible en el laboratorio.

Curva de calibración

Para la construcción de la curva de calibración se partió de un estándar de curcumina (SIGMA) y se prepararon 5 concentraciones comprendidas en un rango de 0.0008 a 0.006 mg/mL. El rango de concentraciones elegido coincide aproximadamente con la concentración de curcumina en los liposomas ensayados.

Cuantificación de curcumina liposomal por espectro-fotometría UV.

En un matraz aforado de 5mL se pesaron las muestras liofilizadas que se prepararon en agua miliQ. El liofilizado de los polímeros con curcumina se disolvió en agua miliQ y enrasó hasta el aforo. Se midió absorbancia a 423nm contra un blanco de agua miliQ.

Concentraciones Calculadas: $c^{final}=V^{SM}c^{SM}/V^{final}$ (mg/mL)

CULTIVO DE CÉLULAS

La línea celular utilizada fue la línea de tumor mamario murino, 4T1. Las células se cultivaron con RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO2. Las células se decolaron con Tripsina- EDTA y resuspendieron en medio de cultivo completo. Las células de la suspensión celular obtenida se contaron con cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con azul de tripán.

Método de Viabilidad Celular por MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

La citotoxicidad de la curcumina liposomal fue estudiada en células 4T1 por el método de viabilidad celular por MTT.

El MTT es un reactivo soluble que es reducido por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial a formazán. El formazán es un precipitado púrpura que se mide por densidad óptica. Cuanto mayor es la densidad óptica del formazán, mayor es la viabilidad celular.

Se sembraron 5.000 células 4T1/pocillo en una placa de 96 pocillos. Al cabo de las 24 hs. se procedió a realizar los tratamientos con distintas concentraciones de las sustancias a ensayar por triplicado.

A las 48 hs.se removió el medio de cultivo y se agregó una solución de medio de cultivo conteniendo MTT (Concentración final = 0,5 mg/mL) a cada pocillo e incubó por 1 h en estufa de cultivo. La solución fue removida y los cristales de formazán se disolvieron con DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente, la absorbancia de cada pocillo fue medida a 570nm en un lector de placas. Se determinó la absorbancia promedio de los triplicados de cada concentración evaluada y se calculó el porcentaje de células viables empleando los pocillos controles como 100 %.

Estudio de captación de curcumina liposomal por MLC (microscopía láser confocal)

Para estudiar la captación celular de las liposomas con curcumina, primeramente las células 4T1 se decolaron con Tripsina- EDTA termostatizada a 37°C y 5% de CO2. Las células se resuspendieron en 10mL de RPMI con 5% de SFB y 100 U/L penicilina/100 g/L estreptomicina, y se pasaron a un tubo de centrífuga. Las células se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el pellet se disoció mecánicamente y se resuspendió. Las células de la suspensión celular obtenida se contaron con cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con azul de tripán.

Se colocaron 5 x 103 células 4T1 cubreobjetos dispuestos en placas de 6 pocillos. Los pocillos se completaron con 2mL de medio de cultivo. Al cabo de las 24 h de incubación en estufa a 37°C y 5% de CO2, las células se trataron con preparación lipídica con curcumina concentración final de curcumina de 10uM (a excepción de los pocillos control de cada línea celular), y las células se incubaron por 48 hs. (a iguales condiciones que el ensayo de MTT). Al término de este tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS 1x y se fijaron 15 minutos a 4°C con paraformaldehído (PFA) al 3 %.

Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS 1x e incubaron 10 minutos con 2 µg/mL de Hoechst (Sigma-Aldrich Co.). Las células sobre los cubreobjetos se montaron colocando una gota de medio de montaje (ProLong Antifade Kit (P7481) de Molecular Probes-Invitrogen) sobre los portaobjetos.

Las muestras se observaron al microscopio láser confocal (MLC), por medio del empleo de los láseres 488 para la observación de las liposomas y 543nm para la observación del lysotraker (marcador lisosomal).

ESTUDIOS CON ANIMALES

Para el experimento se utilizaron ratones BALB/c de 7 semanas de edad, hembras, con un peso de 26.2±3.1 gramos los normales (n=3), mientras que los portadores de tumor de mama inducido (n=3) presentaron un peso de 26.0±1.9 gramos procedentes del URBE (Unidad de Reactivos y Bio-modelos de Experimentación). Se formaron grupos de tres animales por jaula, respetándose los parámetros de superficie requeridos por la especie. El laboratorio de experimentación animal (LEA), cuenta con instalaciones especializadas para regular y estandarizar el macro y microambiente de nuestros reactivos biológicos, la comida y el agua suministrada ad libitum. Los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación de 5 días.

Los tumores de mama 4T1 se inocularon en la zona de tejido mamario (tomando como referencia el pezón de la región pre inguinal izquierda) de los ratones por administración subcutánea de 7,0 x 105 en 0.1mL de buffer fosfato salino (PBS). Luego de diez días de la inoculación, los tumores eran palpables y los ratones se encontraban listos para comenzar los estudios de fluorescencia.

Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Tanto el tumor como los tejidos y órganos de interés fueron extirpados, y se procedió a la colocación en placas de Petri esterilizadas, para la obtención de la imagen de fluorescencia.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de la República, Facultad de Ciencias, UdelaR, respetando todas las reglas y con los medios a garantizar un mínimo de estrés de los animales lo que garantiza su bienestar durante todo el experimento.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como media ± error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba pareada t-student. Fue considerado significativo un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica de curcumina liposomal.

El tamaño medio obtenido de la dispersión liposomal fue de 249nm, el cual resultó tener una distribución de tamaños monodispersa. El porcentaje de encapsulación de curcumina fue de 31%. La transición de fase para éstos ocurrió a una temperatura de 37.1 °C con una entalpía de 301mJ/g como se muestra en la Figura 1.

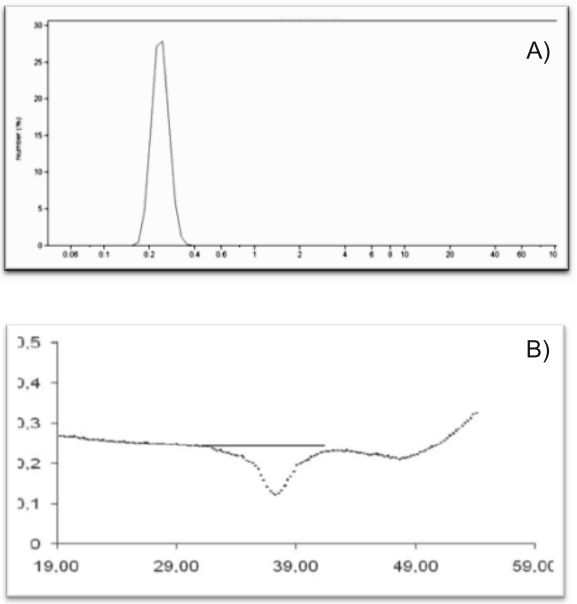


Figura 1. A) Distribución de tamaños de la dispersión de curcumina liposomal utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer. B) Calorimetría diferencial de barrido (DSC) representativo de la formulación de los liposomas con curcumina en escaneo calorimétrico. Transición de fase de los liposomas: ▲H: 301mJ/g; Td: 37.5ºC.

Ensayo de viabilidad celular por (MTT)

Se procedió a hacer el ensayo de viabilidad celular en las células 4T1 de los nanosistemas liposomales con curcumina a las concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 60 µM de curcumina encapsulada. Se pudo observar que la curcumina liposomal presentó cierta citotoxicidad para las células 4T1 a las concentraciones y tiempo ensayados (Figura 2). La citotoxicidad fue confirmada a través de imágenes ópticas de las células (Figura 3).

Si bien hubo efecto antitumoral por parte de la curcumina en estas células, dicho efecto fue inferior al de la curcumina libre. Esta baja actividad antitumoral por parte de la curcumina liposomal, puede deberse a que los liposomas no llegaron a la temperatura de transición de fase (al incubarse el sistema liposomal en las células 4T1). Esto posiblemente se corrija bajando la temperatura de transición de fase, consiguiéndolo a través del aumento de la cantidad de colesterol presente en los nano-sistemas.

Por tal motivo seguimos trabajando en la optimización de la nano-estructura liposomal con curcumina.

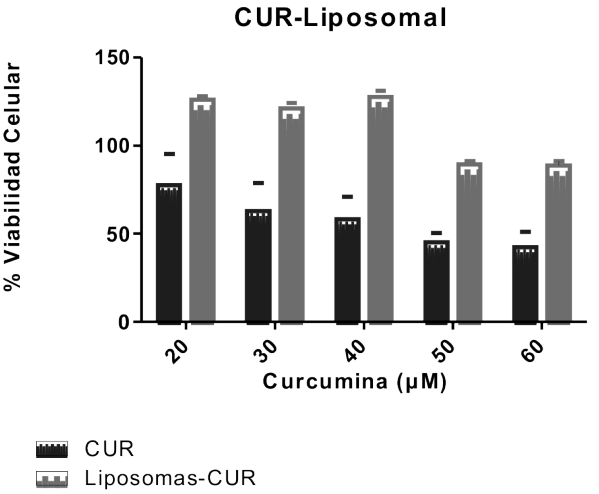


Figura 2. % Viabilidad Celular a distintas concentraciones de curcumina liposomal y curcumina libre. Las barras corresponden a la desviación estándar de los porcentajes de viabilidad celular obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

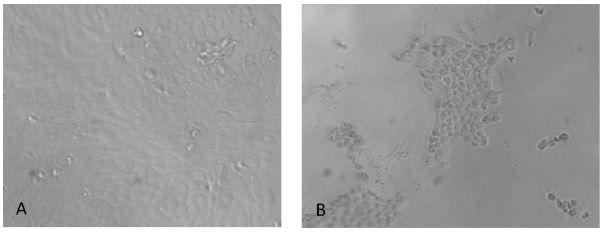


Figura 3. Microscopia Óptica-A) Control de células (sin tratamiento), B) células 4T1tratadas con curcumina liposomal a una concentración de 10 µM de curcumina. Magnificación: 10x.

Análisis de la captación de curcuminaliposomal por células 4T1 por microscopía láser confocal (MLC).

Una vez obtenidos y caracterizados los liposomas con curcumina, se procedió a estudiar la posibilidad de ingreso de los mismos en los cultivos de células 4T1. Se procedió a hacer la microscopia láser confocal a las 24 horas en donde se observó una acumulación preferencial de los mismos en una región citosólica de la célula (Figura 4). Por otra parte, en algunas células, observamos una co-localización de la señal de los liposomas con curcumina (verde) con la señal de Lysotracker (rojo) (amarillo) (Figura 4).

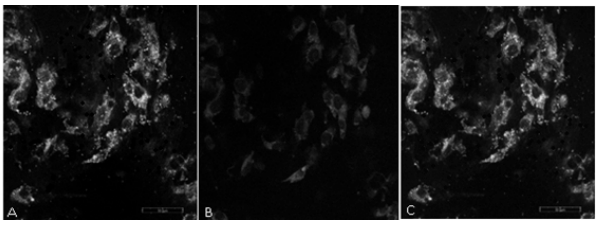
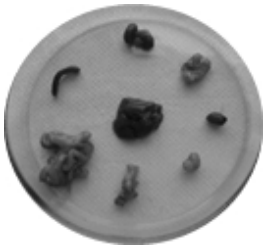


Figura 4. Imágenes de microscopía láser confocal de células 4T1 incubadas con curcumina liposomal por 24 horas. A) Verde: curcuminaliposomal, B) Rojo: Lysotracker. C) Amarillo: "Merge" (colocalización). Magnificación: 60x. Barra de escala: 50 µm.

Imágenes de fluorescencia ex-vivo en animales BALB/c portadores de tumor mamario 4T1

La imagen ex vivo en ratones BALB/c muestra una baja señal de fluorescencia por parte del tumor (el cual se encuentra referenciado con un circulo), lo cual está indicando que la captación de los nano-sistemas por parte del mismo fue baja. Esto puede deberse a una baja extravasación de los liposomas a nivel de la vasculatura tumoral (Figura 5). Se encontró señal de fluorescencia en intestino y estómago. La señal de fluorescencia en estos órganos puede deberse a la ración ingerida por los animales (agregar imagen control para mostrarlo).



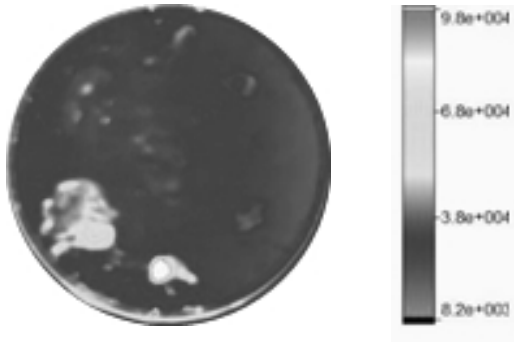


Figura 5. Imagen ex vivo de ratón BALB/c con curcumina liposomal. En donde se observa el tumor marcado con un círculo.

DISCUSIÓN

Llevamos a cabo la encapsulación de la curcumina, con una eficiencia del 30,1 %. Se obtuvieron formulaciones liposomales estables, fueron caracterizadas y mostraron un tamaño nanométrico de 249nm. Estas nano-estructuras presentaron una temperatura de transición de fase de 37,5ºC, la cual es cercana a la temperatura fisiológica. Por lo tanto puede existir una transición que permita una liberación de la curcumina.

La curcumina liposomal a las concentraciones estudiadas, presentó cierta actividad antitumoral en células 4T1. Posiblemente la baja actividad antitumoral de la curcumina liposomal sea debido a que no se llegó a la temperatura de transición de fase, al incubarse el sistema liposomal en las células 4T1. Esto posiblemente se corrija bajando la temperatura de transición de fase a través del aumento del colesterol en los nano-sistemas (a nivel de la bicapa del liposoma). La citotoxicidad por parte de la curcumina liposomal en estas células fue confirmada a través de imágenes de microscopia óptica (Figura 3). Asimismo se estudió la captación de este nano-sistema por las células 4T1, encontrándose que fueron captados y co-localizaron con lisosomas a las 24 horas.

La imagen ex vivo en ratones BALB/c muestra una baja señal de fluorescencia por parte del tumor (Figura 5), lo cual está indicando que la captación de los nano-sistemas por parte del mismo fue baja. Esto puede deberse a una baja extravasación a nivel de la vasculatura tumoral.

Los resultados obtenidos son alentadores e impulsan que se continúe con la investigación de estos liposomas como agentes teragnósticos de tumores sólidos vascularizados.

Nos planteamos continuar este trabajo con la generación de liposomas con temperatura de transición de fase menor, así como liposomas peguilados y glicoliposomas (liposomas derivatizados con glucosa) de modo de mejorar su especificidad por el tumor, que creemos mejoraría la captación a nivel tumoral in vitro e in vivo .

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados in vitro e in vivo obtenidos se puede concluir que estos nano sistemas no resultaron ser los más adecuados para su uso para la entrega de curcumina a tumores.

SUMMARY

Curcumin is a natural polyfenol molecule derived from the Cúrcuma longa plant, showing anti-cancerigen, anti-fungal, anti-viral, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative properties . Curcumin exhibits a wide availability around the world, it is safe, inexpensive, and shows combat functions against multiple types of cancer, justifying its development as a cancer treatment medicine. Nevertheless, various Basic and clinical studies have confirmed its restricted efficacy due to its low solubility, high metabolic rate and low bioavailability. In order to lead curcumin more selectively towards tumor formations and skip all the already mentioned disadvantages, we have studied various liposomal strategies as “nanocarriers” so as to encapsulate curcumin. Therefore, in order to promote curcumin action and “delivery” as an anti-neoplasic agent, it has been Developer a nanosystem of liposomal curcumin. It has been assessed the anti-tumor in vitro effect of curcumin and liposomal curcumin in 4T1 cells of a murin breast tumor and ex vivo studies were performed in a murin model of a breast tumor induced with 4T1 cells. Results obtained have been encouraging; we have been able to encapsulate curcumin, with an encapsulation efficacy of 31%. Steady liposomal formulations were obtained, which could be characterized, showing that they had a nanometric size (240 nm). Curcumin, as well as the Developer nanosystem, with the studied concentrations, were citotoxic in murine 4T1 breast cancer cells. Therefore, the Developer nanosystem has the potencial to develop liposomal formulations in tumor “targeting” applications for imaging and oncologic treatment.

KEY WORDS: DRUG TARGETING
NANOTECHNOLOGY
BREAST NEOPLASMS
NEOPLASMS, DIAGNOSIS

BIBLIOGRAFIA

(1) Maheshwari R, Singh A, Gaddipati J, Srimal R. Multiple biological activities of curcumin: A short review. Life Sci 2006; 78(18):2081-7.

(2) Anand P, Kunnumakkara A, Newman R, Aggarwal B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. Mol Pharm 2007; 4(6):807-18.

(3) López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. Mol Nutr Food Res 2008; 52(Suppl.1):103-27.

(4) Shenoy D, Amiji M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(??-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. Int J Pharm 2005; 293(1-2):261-70.

(5) Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et.al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett 2013; 8(1):102.

(6) Fan Y, Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. Asian J Pharm Sci 2013; 8(2):81-87.

(7) Angius F, Floris A. Toxicology in Vitro Liposomes and MTT cell viability assay : An incompatible affair. Toxicol Vitr 2015; 29(2):314-9.

(8) Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. Int J Nanomedicine 2015; 2(10):975-99.

(9) Gregoriadis G, Florence A. Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. Drugs 1993; 45(I):15-28.

(10) Johnston M, Semple S, Klimuk S, Ansell S, Maurer N, Cullis P. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. Biochim Biophys Acta 2007; 1768(5):1121-7.

(11) Noble C, Guo Z, Hayes M, Marks J, Park J, Benz C, et.al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 64(4):741-51.

(12) Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr Drug Deliv 2007; 4(4):297-305.