

Estudio de la afinidad de nanopartículas magnéticas-RGD en un modelo murino experimental de metástasis hepáticas

Borja Herrero de la Parte

Trabajo de Fin de Máster
Máster en Investigación Biomédica
Curso 2013/2014
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

1. Resumen	2
2. Introducción	2
2.1. Cáncer colorrectal	2
2.2. Integrinas $\alpha_v\beta_3$ y péptidos RGD	4
2.3. Nanotecnología y cáncer. Nanopartículas magnéticas.....	4
3. Objetivos	6
4. Material y métodos	7
4.1. Células CC-531	7
4.2. Determinación de la intensidad de fluorescencia de los peptidomiméticos RGD-fluoresceína.....	7
4.3. Cuantificación de peptidomiméticos RGD-fluoresceína adheridos a células CC-531	8
4.4. Modelo experimental animal.....	8
4.5. Inducción de metástasis hepáticas	8
4.6. Nanopartículas magnéticas.....	9
4.6.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas y funcionalización con peptidomiméticos RGD.....	9
4.6.2. Caracterización estructural y funcional de nanopartículas magnéticas	10
4.7. Infusión intra-arterial de MNp-RGD.....	10
4.8. Estudios de adhesión de MNp-RGD al tejido hepático	10
4.9. Análisis de la distribución de Fe en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.	10
4.10. Identificación histológica de los depósitos de Fe en hígados infundidos con MNp-RGD	11
4.11. Análisis estadísticos	11
5. Resultados y Discusión	12
5.1. Detección de la fluorescencia emitida por RGD-fluoresceína	12
5.2. Adhesión de RGD-fluoresceína a células tumorales CC-531.....	12
5.3. Validación del modelo tumoral de metástasis hepáticas.....	14
5.4. Localización y cuantificación de las MNp-RGD en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.....	15
6. Conclusiones	18
7. Bibliografía	19

1. Resumen

Las nanopartículas magnéticas (MNp) se han propuesto como nuevo agente terapéutico contra las metástasis hepáticas. Estas MNp adheridas selectivamente al tejido tumoral mediante peptidomiméticos RGD, podrían inducir incrementos térmicos locales por la exposición a campos magnéticos giratorios.

Para analizar la afinidad de las nanopartículas magnéticas-RGD (MNp-RGD) por las células tumorales CC-531, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* e *in vivo*. Mediante estudios *in vitro*, se comprobó la adhesión selectiva de peptidomiméticos RGD a células CC-531.

La inducción tumoral se realizó mediante inyección ecoguiada de células CC-531 en 6 ejemplares de WAG/RijCrI. Los 4 animales que desarrollaron metástasis hepáticas, recibieron infusiones de MNp-RGD por la vía intra-arterial hepática. Posteriormente, mediante resonancia magnética (RM) de 1,5 T se practicaron secuencias STIR, DP* y T2*. Tras la necropsia de los animales, se tomaron muestras de hígado sano y tejido tumoral para cuantificar mediante espectrometría (ICP-MS) las concentraciones de Fe y su posterior localización histológica. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante test no paramétricos.

El análisis por RM demostró que el parénquima hepático sano presentaba una mayor caída de la intensidad de señal (IS) que el tejido tumoral. La ICP-MS reveló la existencia de depósitos férricos en el tejido tumoral ($71,25 \mu\text{g} \pm 8,22$), pero la cantidad de Fe en el tejido hepático sano fue mayor ($268,2 \mu\text{g} \pm 46,28$). La concentración de Fe exógeno en el hígado sano mostró diferencias significativas con respecto al tejido tumoral. Las secciones histológicas evidenciaron que las MNp-RGD fueron probablemente captadas inespecíficamente por las células de Kupffer del tejido hepático sano y se adhirieron selectivamente al estroma peritumoral.

2. Introducción

2.1. Cáncer colorrectal

Las neoplasias colorrectales son uno de los procesos cancerígenos más frecuentes en el mundo occidental, constituyendo la tercera causa de patología tumoral y siendo responsables de un elevado porcentaje de enfermedad metastásica de asiento hepático. Casi la mitad de los pacientes aquejados de neoplasia colorrectal desarrollarán metástasis hepáticas en el curso de su enfermedad, y en un 15-25% de los afectados están ya presentes en el momento del diagnóstico [1, 2].

En la actualidad, la mejor opción terapéutica de las metástasis hepáticas es la exéresis quirúrgica, puesto que ofrece las mejores supervivencias a largo plazo, con tasas a los cinco años en torno al 24-38%, logrando cifras del 58% en series concretas de

pacientes [3, 4]. Sólo entre un 8 y un 27% de los afectados por metástasis hepáticas serán candidatos a la extirpación quirúrgica de las mismas [5]. Para el resto de los pacientes, existen alternativas de tratamientos locales con los que se pretende conseguir supervivencias similares a la opción quirúrgica. Estas alternativas son la punción transparietal percutánea y terapias transarteriales.

El objetivo de la punción transparietal percutánea es provocar la necrosis tisular mediante procedimientos químicos, inyectando sustancias citotóxicas en el lecho tumoral, o térmicos, a través de una aguja inductora de radiofrecuencias. Esta punción se realiza a través de la piel y es guiada mediante técnicas de imagen, tales como la ecografía o la tomografía computerizada. Este último procedimiento permite el tratamiento de metástasis de volúmenes mayores y está indicado en pacientes no quirúrgicos [6]. Ambas técnicas presentan contraindicaciones asociadas a algunas patologías previas (ascitis no reversible o coagulopatía) o a la existencia de metástasis extra-hepáticas [7, 8], así como pacientes con marcapasos en el caso de la termoablación [6].

Los tratamientos transarteriales consisten en la administración endo-vascular de diferentes agentes terapéuticos que llegarán selectivamente por vía arterial al lecho tumoral. Esto se debe a que las metástasis hepáticas colorrectales reciben irrigación vía arteria hepática, mientras que el parénquima hepático sano lo hace vía venosa [9, 10].

Estas terapias antitumorales locales tienen una eficacia relativa, ya que consiguen tasas de supervivencia a cinco años de un 40% [11], presentando además un mayor riesgo de recidiva en pacientes sometidos a tratamientos con radiofrecuencia, debido a la producción de citoquinas durante la regeneración del hígado [12].

Es por ello que actualmente los esfuerzos se centran en el desarrollo de nuevas terapias que discriminen mejor las células neoplásicas, haciendo que éstas sean más vulnerables a dichas terapias que las células sanas. Las investigaciones con estas nuevas terapias se focalizan, entre otras, en el estudio de agentes antiangiogénicos [13], procedimientos de termoterapia inducida por láser [14] o por MNp [15, 16, 17]

Las terapias basadas en agentes antiangiogénicos están fundamentadas en el principio de que durante el desarrollo de tumores sólidos y metástasis, éstos necesitan un gran aporte sanguíneo y por tanto los fenómenos neoangiogénicos son una pieza clave. La interacción de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ con ligandos específicos juega un papel importante en este fenómeno [18]. Ésta integrinas están altamente expresadas en las células endoteliales de los vasos tumorales neoformados y en las células tumorales, pero apenas están expresadas en el resto de órganos y tejidos sanos [19]. Por lo tanto, el desarrollo de agentes antitumorales o de otras estrategias terapéuticas dirigidos selectivamente contra estas integrinas puede permitir una acción más localizada sobre las células tumorales y sobre los neovasos que irrigan al tumor, evitando un daño sistémico generalizado.

2.2. Integrinas $\alpha_v\beta_3$ y péptidos RGD

Las integrinas son un grupo de moléculas glicoproteicas que controlan mayoritariamente la adhesión de las células a la matriz extracelular. Están formadas por dos subunidades heterodiméricas: subunidad α , que está formada a su vez por dos cadenas unidas por un puente disulfuro; y subunidad β , cuya porción extracelular reconoce la secuencia tripeptídica RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). Es esta subunidad la que presenta un mayor interés para el desarrollo de nuevas terapias que incluyan en su estructura dicha tríada. Estos compuestos de síntesis artificial análogos a los péptidos naturales a los que imitan se denominan comúnmente peptidomiméticos. Su similitud les permite desplazar al péptido natural de receptores y unirse en su lugar. Se preparan manteniendo la secuencia del péptido natural, alterando mínimamente su entorno a través de aminoácidos o enlaces amídicos modificados (pseudopéptidos) u otro tipo de enlaces no amídicos. Todo esto les otorga una mayor resistencia metabólica debido a que los peptidomiméticos no son reconocidos por las proteasas [20].

2.3. Nanotecnología y cáncer. Nanopartículas magnéticas

La nanotecnología ha desempeñado un papel relevante en las diversas áreas científicas en las dos últimas décadas, abriendo las puertas a un gran abanico de posibilidades dentro de la investigación, debido a las características que adquiere la materia a escala nanométrica que difieren de las observadas en estado masivo. Si bien es cierto que las aportaciones de esta interesante tecnología se encuentran en fase inicial, se prevé que en los próximos años acabe revolucionando los diferentes campos de aplicación.

Fue durante los años 80 cuando la investigación de estos materiales irrumpió definitivamente en la comunidad científica. Desde ese momento, el estudio de ese tipo de materiales ha suscitado un gran interés, no sólo por las numerosas aplicaciones surgidas en relación a su tamaño nanométrico sino también por los importantes cambios observados en la estructura electrónica, la conductividad, la reactividad, la temperatura de fusión y las propiedades mecánicas cuando el tamaño de las partículas se reduce por debajo de un tamaño crítico. Por otra parte, si tenemos en cuenta el interesante comportamiento magnético de los materiales nanométricos y la coincidencia de escala de tamaño con las unidades básicas biológicas (componentes celulares, DNA, cromosomas.... (figura 1)) es de esperar que los nanomateriales magnéticos adquieran especial relevancia en el área biomédica.

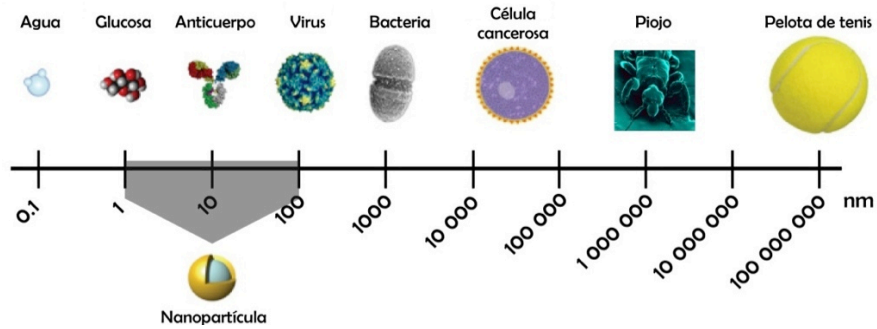


Figura 1.- Tamaño de las MNp en comparación con otros elementos comunes.

Estos hechos han condicionado la utilización de las MNp en procesos de diagnóstico, hipertermia y el transporte selectivo de fármacos, todos ellos con un prometedor futuro en la terapia contra el cáncer.

La hipertermia magnética se define como el calentamiento producido por un material al aplicar un campo magnético. La idea de emplear partículas magnéticas para calentar y destruir tumores ya fue introducida por primera vez por Gilchrist en 1957 [21] y reforzada por estudios desarrollados por Jordan [22] y Nielsen [23], sucesivamente. Estos estudios permitieron demostrar que un aumento moderado de la temperatura entre 40 y 43°C aumenta la sensibilidad de las células frente a los efectos de la radio y de la quimioterapia. Así, combinando los tratamientos actuales con el calentamiento estable y homogéneo de la masa tumoral se precisarían dosis más bajas de radiación o quimioterapia para lograr la regresión tumoral, reduciendo los efectos adversos. Existe también la posibilidad de aumentar la temperatura por encima de 46°C, provocando la muerte celular por necrosis; no obstante, los efectos perjudiciales ejercidos sobre células sanas que se encuentran en las proximidades son considerables, por lo que resulta necesario minimizarlos diseñando MNp conjugadas con marcadores específicos que alcancen exclusivamente las células tumorales, para evitar daños en tejidos sanos adyacentes.

Debido a sus potenciales aplicaciones, se han establecido numerosas rutas sintéticas para la obtención de MNp, siendo una de las más empleadas la descomposición térmica en presencia de surfactantes. A pesar del prometedor aumento en el control de las propiedades del sistema, el uso de disolventes tóxicos y surfactantes reducen la biocompatibilidad del mismo.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que estas MNp tienen como objetivo final la infusión en un medio biológico, es necesario que establezcan estabilidad coloidal en un entorno fisiológico, así como una alta biocompatibilidad. Otro problema es el tamaño de las MNp, ya que deben ser menores de 100 nm, para evitar sufrir procesos de opsonización y eliminación por los macrófagos. En definitiva, cuanto más pequeña, neutra e hidrofílica sean las MNp, más posibilidades tendrán de escapar a los procesos de depuración.

Por otro lado, existe la necesidad de que las MNp actúen sobre una determinada diana y esto sólo se consigue mediante una funcionalización específica. Como se ha descrito antes, en las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal hay una sobreexpresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ capaces de reconocer el péptido cíclico RGD, lo que puede permitir que al funcionalizar las MNp con esta secuencia peptídica, éstas queden depositadas selectivamente en el lecho tumoral y no en el parénquima hepático. Existen múltiples técnicas químicas mediante las cuales se realiza la modificación superficial de MNp con ligandos que resulten adecuados para su posterior tratamiento con el RGD, como por ejemplo la química *click* [24, 25].

3. Objetivos

- Analizar la capacidad de adhesión de peptidomiméticos RGD a las células de adenocarcinoma de colon CC-531 *in vitro*.
- Analizar la afinidad diferencial *in vivo* de MNp-RGD al tejido tumoral y al tejido hepático sano.

4. Material y métodos

4.1. Células CC-531

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado células de adenocarcinoma de colon de rata, CC-531, adquiridas en origen a Cell Line Service (Alemania) de pase 21, las cuales se amplificaron en nuestras instalaciones hasta pase 24, stock utilizado en éstas experiencias.

La expansión y almacenamiento de los viales adquiridos se realizó descongelando y atemperando los viales rápidamente en baño caliente a 37°C y sembrando seguidamente las células en frasco de cultivo T-25 (Cell Culture Flasks; Corning) con medio de cultivo RPMI+20% SBF. Una vez adheridas al frasco de cultivo (4-5 horas), se retiró el medio y se añadió medio nuevo (RPMI + 10% SBF). Cuando las células llegaron a estado de confluencia, se despegaron con Tris-EDTA, se sembraron en un frasco de cultivo T-75 (Cell Culture Flasks; Corning) y se mantuvieron en el medio de cultivo, suplementado con Penicilina (100 UI/ml)/Estreptomina (100 mg/ml), en un incubador a 37°C de temperatura, atmósfera húmeda y 5% de CO₂. El stock obtenido se congeló en SBF + 10% DMSO (dimetilsulfóxido).

Para cada experiencia se descongeló un nuevo criovial, usándose sólo aquellos cultivos en los que la viabilidad celular fuese igual o superior al 95%.

Una vez las células estuvieron en confluencia, se despegaron del frasco de cultivo y se centrifugaron para obtener el pellet, el cual se resuspendió en medio RPMI, calculándose el volumen de esta suspensión para conseguir una concentración de 15×10^3 células/ml necesaria para sembrar las placas de 24 pocillos y hacer el ensayo de adhesión de RGD *in vitro*.

4.2. Determinación de la intensidad de fluorescencia de los peptidomiméticos RGD-fluoresceína

A los peptidomiméticos empleados en los experimentos *in vitro* se les añadió mediante química *click* una molécula de fluoresceína. La determinación de fluorescencia de éste fluorocromo adherido a RGD se realizó en un fluorímetro SynerGy HT (BioTEK) configurado con una longitud de onda de emisión de 521 nm y de absorción de 494 nm. Además, mediante microscopía de fluorescencia, se obtuvieron imágenes de las células marcadas.

Debido a la escasa bibliografía previa sobre el uso de análogos RGD, en un primer momento se determinó la concentración idónea de éstos que permita la realización de medidas de fluorescencia en un lector de placas. Para ello, en placas de 96 pocillos, se depositaron muestras de 100 µl de diferentes concentraciones de peptidomiméticos RGD. Una vez determinada la concentración de RGD a emplear se realizaron ensayos para

comprobar el tiempo que se debía mantener el RGD en cultivo con las células antes de la lectura mediante el fluorímetro.

4.3. Cuantificación de peptidomiméticos RGD-fluoresceína adheridos a células CC-531

Para la lectura de las placas se retira todo el medio de cada pocillo y se lavan con PBS sin provocar agitación para no despegar las células adheridas a la placa. Se elimina el PBS de lavado y se añade medio de cultivo (RPMI + 10% SBF). Esta lectura se realiza también en un fluorímetro SynerGy HT (BioTEK) configurado con una longitud de onda de emisión de 521 nm y de absorción de 494 nm.

4.4. Modelo experimental animal

Como modelo experimental se emplearon ratas singénicas Wag/RijCrl. Los animales, estabulados en grupos de 4, se han mantenido en ritmo circadiano de 12 horas, con alimentación (PanLab A-04) y bebida "ad libitum".

Todos los procedimientos se practicaron de acuerdo a la legislación vigente sobre experimentación animal dictada por el Gobierno de España (Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio y Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia).

4.5. Inducción de metástasis hepáticas

Para la inducción tumoral se emplearon 6 ejemplares macho Wag/RijCrl de 3 meses y un peso aproximado de 300 gramos, siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU: CEBA/140/P02-01/2010/AlonsoVarona.

Bajo anestesia con isoflurano al 3%, el animal se coloca en posición decúbito supino. Se depila la zona abdominal mediante crema depilatoria para permitir el uso del transductor ecográfico. Una vez depilado, se lava la piel con alcohol con el fin de limpiar la zona a trabajar y aplicando gel para ultrasonidos se localiza mediante el uso de un ecógrafo Esaote MyLab60 Xvision con una sonda de 6-18 MHz el lóbulo lateral izquierdo (LLI) y se inyecta 0,05ml de suspensión celular (5×10^6 células/ml) con una aguja de 27G.

El control ecográfico de los animales se realizó a los 28 días. Los implantes tumorales se dejaron evolucionar hasta los 35 días para lograr el volumen tumoral deseado.

4.6. Nanopartículas magnéticas

4.6.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas y funcionalización con peptidomiméticos RGD

Las MNp fueron sintetizadas en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencia y Tecnología por parte del equipo de la Prof. Maite Insausti Peña, y cedidas para la realización de este estudio.

En su preparación se empleó el método de la descomposición térmica usando un polialcohol que actúa como disolvente, agente reductor y agente estabilizante. Para la obtención de MNp de más de 7 nm se recurre al método de crecimiento en semilla, ya que la descomposición térmica suele conducir a MNp de tamaño pequeño (4-6 nm).

El recubrimiento de las MNp con una capa orgánica que permita su funcionalización con peptidomiméticos RGD se realizó con el polímero poli anhídrido maleico-alt-1-octadeceno (PMAO, figura 2), ya que el alto número de cadenas alifáticas permite una unión multipuntual de la nanopartícula.

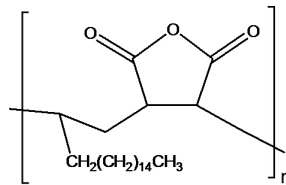


Figura 2.- Estructura del poli (anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO).

Además, la hidrólisis de los anillos anhídrido que quedan orientados hacia el exterior dota a las partículas de la hidrofiliad necesaria para ser solubles en agua (figura 3). Los grupos carboxilato formados de la ruptura de los anillos anhídrido estabilizan las MNp en agua y ofrecen la posibilidad de unir covalentemente cualquier molécula que posea un grupo terminal amino mediante la formación de un enlace amida.

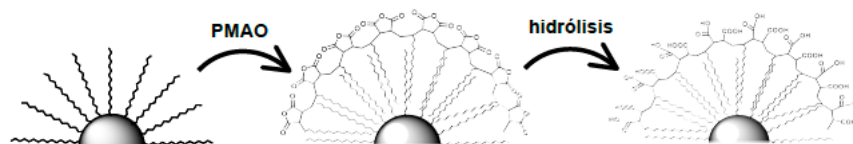


Figura 3.- Esquema del recubrimiento polimérico con PMAO y su posterior hidrólisis.

A estos grupos carboxilato se unió un espaciador oligoetilenglicol a través de su grupo amino, de forma que queda un grupo azido terminal que, mediante química *click*, permite la adición de la molécula de RGD. Este procedimiento se realizó por el grupo del Prof. Jesús M^a Aizpurúa, del Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la UPV/EHU

4.6.2. Caracterización estructural y funcional de nanopartículas magnéticas

La caracterización estructural y morfológica se ha llevado a cabo mediante Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) respectivamente, permitiendo así obtener el tamaño, forma y distribución de las partículas. Además se ha estudiado la presencia de ligando a través de la Espectroscopía Infrarroja (IR) y la cantidad del mismo por Termogravimetría.

4.7. Infusión intra-arterial de MNp-RGD

Para la infusión de las MNp funcionalizadas con RGD se siguió el procedimiento aprobado por el CEBA de la UPV/EHU: CEBA/140/P02-02/2010/AlonsoVarona.

Los animales fueron de nuevo anestesiados con isoflurano al 3% y colocados en posición de cúbito supino. Se practicó una laparotomía dejando expuesta la cavidad abdominal, se evisceró y se disecó la arteria esplénica. Una vez que la vía de administración está lista, se realizó una punción con una aguja de 30G y se canalizó la arteria mediante una microcánula de poliuretano de 0,014" (Harvard Apparatus) conectada a una bomba de infusión lenta para la administración de las MNp.

Para conseguir la hemostasia tras la infusión de las suspensiones se practicó una compresión de la arteria esplénica durante 5 minutos. Pasado este tiempo y comprobado que no hay hemorragia, se procedió a introducir de nuevo todo el paquete abdominal en el interior de la cavidad abdominal, respetando las posiciones anatómicas originales de cada órgano y se sutura con seda de 3/0, aplicando una crema de povidona iodada (Betadine®).

El procedimiento se realizó en seis ratas, a las cuales se administró entre 0,62-0,7 mg de MNp-RGD suspendidas en 0,58-1 ml de PBS 1:10.

4.8. Estudios de adhesión de MNp-RGD al tejido hepático

Los estudios de adhesión de MNp funcionalizadas con RGD se realizaron mediante RM. En las primeras 12 horas tras la infusión de las MNp, se sometió a los animales a estudios de RM en un equipo Siemens Symphony de 1,5T. Se practicaron las secuencias axial y coronal STIR, DP* y T2*, en busca de cambios en la IS compatibles con la presencia de Fe.

4.9. Análisis de la distribución de Fe en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.

Para una valoración de la cantidad de Fe depositado tanto en el lecho tumoral como en el parénquima hepático sano, se realizó un análisis por Espectrometría de Masa con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Dicho análisis fue realizado por el grupo del Prof. Néstor Etxebarria Loizate en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU.

4.10. Identificación histológica de los depósitos de Fe en hígados infundidos con MNp-RGD

Las muestras de hígado para el análisis histológico se obtuvieron mediante necropsia inmediatamente después de la realización de la RM. Se practicó la eutanasia a los animales y se realizó una laparotomía media para poder extraer el lóbulo lateral izquierdo para su fijación en formaldehído al 4%. Tras su deshidratación mediante pasos sucesivos en alcoholes de graduación creciente, se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones histológicas de 5 μm de grosor que se tiñeron con la técnica de azul de Prusia para marcar, selectivamente, los depósitos de Fe.

4.11. Análisis estadísticos

Las variables cuantitativas referentes a la fluorescencia emitida por los peptidomiméticos marcados con fluoresceína se ha descrito mediante la media y desviación estándar y también como un gráfico de líneas. El análisis estadístico se ha realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Una vez demostradas diferencias significativas entre los grupos mediante Kruskal-Wallis, las comparaciones de los distintos grupos entre sí se efectuaron mediante el test de comparación múltiple de Dunn.

La cantidad de Fe detectado por ICP-MS se presentó como el rango, la media y la desviación estándar y gráficamente mediante un gráfico de columnas con la media y la desviación estándar. Se comprobó que los datos eran normales y se realizó un test de la t de Mann-Whitney.

Todos los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6, aceptando un nivel mínimo de significación $p < 0,05$.

5. Resultados y Discusión

5.1. Detección de la fluorescencia emitida por RGD-fluoresceína

Previamente a iniciar los estudios de adhesión de los peptidomiméticos RGD sobre las células CC-531, se determinó la emisión de fluorescencia de diferentes concentraciones de los análogos RGD marcados con fluoresceína. Para ello, en una placa de 96 pocillos, se dispusieron un rango de concentraciones de RGD-fluoresceína (10, 25, 50, 100 y 1000 μM) y se evaluó la emisión de fluorescencia en un fluorímetro, obteniéndose unos valores de 9536 ± 156 , 14783 ± 1321 , 23542 ± 2116 , 37852 ± 4175 y 76013 ± 1704 UAF, respectivamente (figura 4).

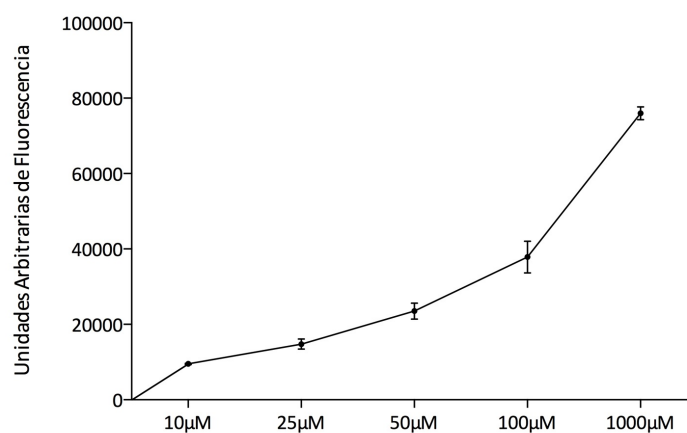


Figura 4.- Representación gráfica de los valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia emitida por diferentes concentraciones de RGD-fluoresceína en medio de cultivo.

Se determinó que la concentración de peptidomiméticos RGD óptima a emplear en los posteriores ensayos de adhesión sobre células CC-531 es la concentración de 50 μM , ya que dicha concentración permite obtener señal de suficiente intensidad, manteniendo una relación coste-beneficio aceptable.

5.2. Adhesión de RGD-fluoresceína a células tumorales CC-531

Se realizó un ensayo en placas de 24 pocillos para determinar el tiempo y las condiciones óptimas de cultivo. Se pusieron en contacto las células en crecimiento exponencial con los peptidomiméticos y se realizaron medidas de la fluorescencia emitida tras un tiempo de exposición de 1, 2, 3 y 4 horas. Con el objetivo de determinar la fluorescencia emitida por los peptidomiméticos RGD-fluoresceína adheridos específicamente a las células, se analizó la señal emitida por los RGD-fluoresceína de los pocillos lavados con PBS como paso previo a la lectura en el fluorímetro.

Como se observa en la tabla 1, tras una hora de exposición se detecta fluorescencia emitida por los RGD-fluoresceína en los pocillos de las placas de cultivo. Tras una exposición de 2 horas, la fluorescencia detectada es un 57% mayor respecto a la observada en el tiempo de 1 hora y, además, es el valor máximo alcanzado, ya que la intensidad de fluorescencia decae a las 3 y 4 horas.

Tabla 1.- Valores promedio y desviación estándar de la fluorescencia emitida por los RGD-fluoresceína

	Control	1 hora de exposición	2 horas de exposición	3 horas de exposición	4 horas de exposición
Lavado con PBS	59,33 ± 2,58	1.909 ± 201,8	3.016 ± 479,8	2.093,6 ± 322,7	2.466 ± 468
No lavado con PBS		78.520 ± 910	86.030 ± 859,3	73.478 ± 1224	76.357 ± 3237,6

Por otro lado, el lavado de los pocillos de las placas de cultivo con PBS provoca una caída de la señal de fluorescencia detectada, siendo la intensidad de los pocillos lavados entre 30-40 veces menor a la fluorescencia detectada en los pocillos sin lavar (figura 5).

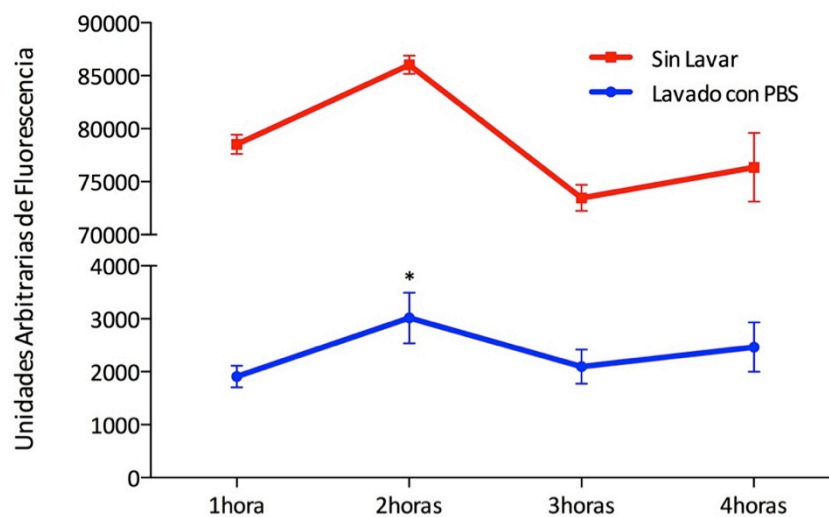


Figura 5.- Representación gráfica del promedio y desviación estándar de la fluorescencia emitida por los RGD-fluoresceína a distintos tiempos de exposición, lavados con PBS (línea azul y sin lavar (línea roja) antes de la lectura de la fluorescencia (línea azul).

Adicionalmente, y como evidencia visual de que los RGD-fluoresceína estaban adheridos a las células en cultivo, se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia (figura 6A) y microscopía de campo claro (figura 6B). En ambas imágenes se observa como el RGD-fluoresceína aparece adherido en la superficie de las células aisladas y únicamente en la periferia de aquellas células que habían proliferado formando agregados, sin que difundan al interior de los mismos.

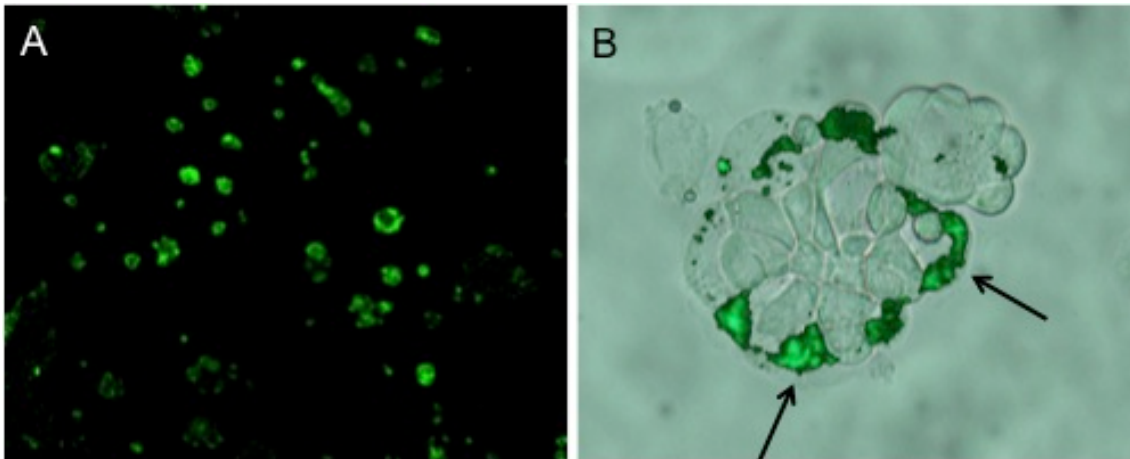


Figura 6.- Imágenes de microscopía de fluorescencia 100x (A) y microscopía de campo claro 200x (B) de células CC-531 cultivadas con RGD-fluoresceína. Las flechas señalan la zona de unión de los RGD-fluoresceína a las células situadas en la periferia de los agregados.

Teniendo en cuenta estos resultados y dado que no se encontraron estudios previos ni protocolos testados para el empleo de análogos de péptidos RGD sobre células tumorales en cultivo, se estableció un tiempo de 2 horas de exposición de las células CC-531 a los RGD-fluoresceína, ya que en ese periodo de tiempo los peptidomiméticos se adhieren a la superficie celular. Además, también se estableció, como paso previo a la lectura en el fluorímetro, el lavado de los pocillos con PBS para eliminar toda la fluorescencia que debida a la adhesión inespecífica de los RGD-fluoresceína al fondo de los pocillos de las placas de cultivo.

5.3. Validación del modelo tumoral de metástasis hepáticas

La inducción ecoguiada de metástasis hepáticas dio lugar al desarrollo de implantes tumorales en 4 de los 6 animales inoculados con las células CC-531 (67%).

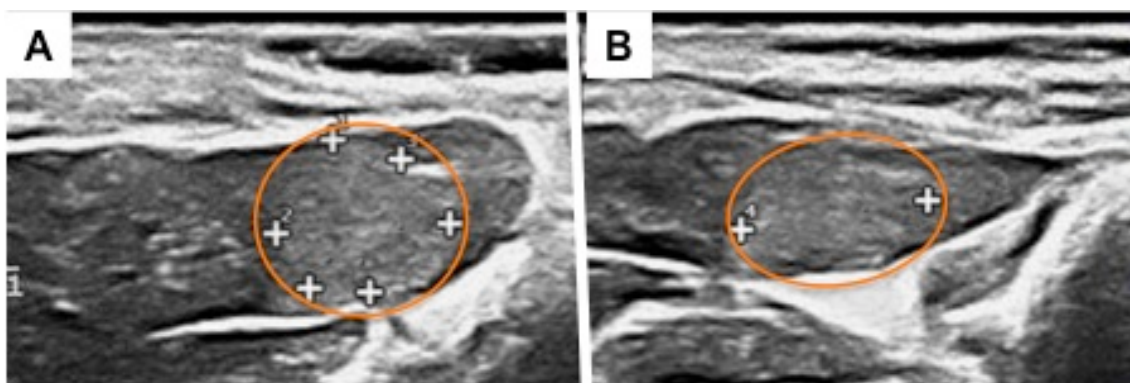


Figura 7.- Imagen ecográfica de un corte longitudinal (A) y transversal (B) del hígado. La zona enmarcada por la elipse muestra un implante con un volumen de $0,8 \text{ cm}^3$.

El volumen de las lesiones tumorales se determinó ecográficamente 28 días después de la inoculación celular, obteniendo rangos de volumen tumoral entre $0,67-1,6 \text{ cm}^3$. Para ello, se realizaron medidas de las lesiones en corte longitudinal y transversal (figura 7A y B) y se calculó el volumen empleando el software del ecógrafo.

Tanto el porcentaje de implantación como el rango de volumen tumoral presente a los 28 días de la inoculación están dentro del rango habitual en éste tipo de procedimiento, coincidiendo con datos previos de nuestro grupo [27].

5.4. Localización y cuantificación de las MNp-RGD en el tejido tumoral y el parénquima hepático sano.

Con el objetivo de localizar el Fe depositado en el tejido tumoral y en el parénquima hepático sano, a los 35 días de la inducción tumoral se procedió a la infusión de las MNp-RGD y al posterior análisis mediante RM.

Mediante la secuencia STIR (figuras 8A y B) se localizaron las masas tumorales hepáticas (círculo naranja), mientras que con las secuencias DP* (figuras 8C y D) y T2* (figuras 8E y F), específicas para la excitación del Fe, se valoró la variación en la IS (hipointensidad) por el acúmulo de MNp-RGD, tanto en el hígado sano como en el tumor (tabla 2).

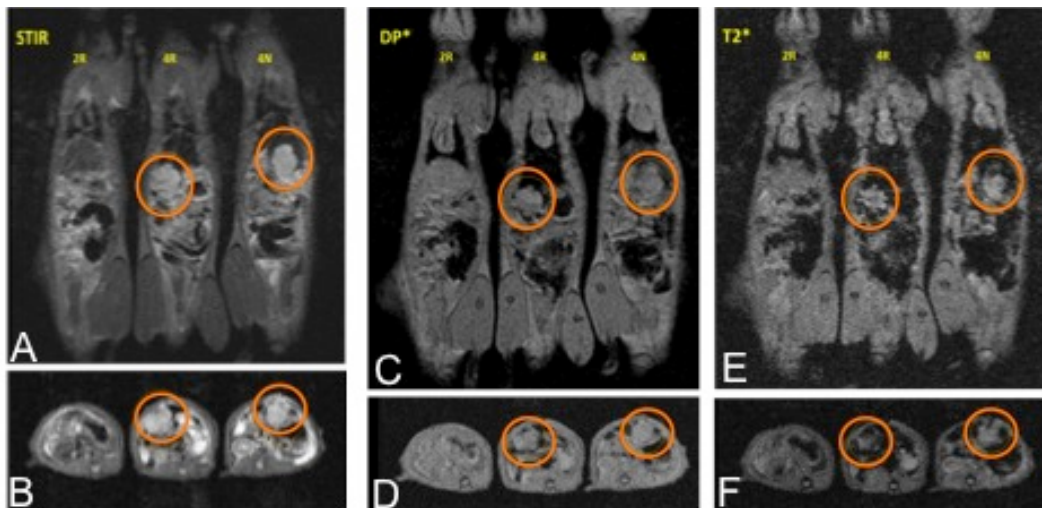


Figura 8.- Secuencias STIR, DP* y T2* de RM de los animales 2R (control, izquierda), 4R (centro) y 4N (derecha). Los círculos naranjas enmarcan las metástasis hepáticas.

La mayor acumulación de Fe en el parénquima hepático sano y la caída de la IS se deben probablemente a una captación inespecífica del Fe por parte de las células de Kupffer. En el tejido tumoral apenas se observa caída de la IS, salvo en zonas periféricas y en algunos pequeños focos intra-tumorales, debido a que las MNp-RGD son incapaces de difundir al interior de los mismos, quedando en el estroma fibrovascular peritumoral.

Para la cuantificación de MNp-RGD fijadas en el tejido hepático sano y en el tejido tumoral, se realizó un análisis mediante ICP-MS. La tabla 2 refleja los datos de concentración de Fe obtenidos en cada animal y la correlación con la caída de la IS observada en las imágenes de RM.

Tabla 2.- Valoración cualitativa de la caída en la IS: leve (+), moderada (++) y severa (+++); y cuantificación mediante ICP-MS de la concentración de Fe exógeno en el tejido hepático sano y en el tejido tumoral.

Animal	Caída de IS		[Fe] ($\mu\text{g/g}$)	
	Tejido hepático sano	Tejido Tumoral	Tejido hepático sano	Tejido Tumoral
3N	++	=	246,7	60,4
4N	+	=	223,9	80,2
3R	++	=	270,6	73,4
4R	+++	=	331,4	71
2R (control)	=			
3A (control)	=			

En el tejido tumoral la concentración de Fe es 4 veces menor al tejido hepático sano.

Incrementos de 150 unidades en la concentración de Fe detectado produce una disminución de la IS leve, aumentos de 200 unidades causan una bajada moderada de la IS e incrementos de 250 unidades produce la máxima caída de la IS.

En el hígado sano infundido con MNp-RGD se encontró una concentración de Fe ($268,2 \mu\text{g} \pm 46,28$) superior a la observada en el tejido sano de animales que no recibieron aporte de Fe exógeno ($138,3 \mu\text{g} \pm 51,6$) [27], siendo el ratio 1,93:1, es decir, la concentración de Fe detectada en el parénquima hepático sano de ratas infundidas con MNp-RGD es aproximadamente el doble a la detectada en el hígado sano de animales no infundidos. Por otro lado, la concentración de Fe determinada en los implantes tumorales de ratas infundidas con MNp-RGD ($71,25 \mu\text{g} \pm 8,22$) presentó un ratio de 1,45:1 respecto al Fe encontrado en el tejido tumoral de animales que no recibieron MNp-RGD ($49 \mu\text{g} \pm 31,9$) [27] (figura 9). Estos datos indicaban que al menos una parte de las MNp-RGD se había adherido a los implantes tumorales.

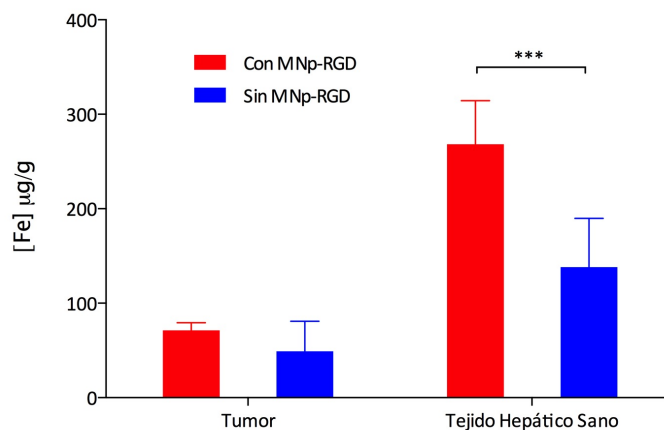


Figura 9.- Gráfico de barras que representa la media y la SD de la concentración de Fe en microgramos por gramo de tejido tumoral y de tejido sano, de hígados infundidos con MNp-RGD (rojo) y no infundidos con MNp-RGD (azul).

Finalmente, en los estudios histológicos, se observaron escasos depósitos de Fe en algunas estructuras vasculares probablemente asociados a las células de Kupffer del hígado sano (figura 10A). Este dato podría indicar que parte de las MNp-RGD han sido atrapadas por las células del sistema monocito-macrófago hepático y, por tanto, la homogénea distribución de los depósitos de Fe magnético en las células de Kupffer provoca la intensa caída de la IS hepática en la RM.

En los implantes tumorales se observaron acúmulos dispersos de Fe en diferentes localizaciones: en el estroma fibrovascular peritumoral (figura 10B y E), en el límite entre tejido hepático sano y tumor (figura 10D), en el estroma fibrovascular de algunos ejes vasculares intra-tumorales y en el endotelio o intersticio peri-endotelial de capilares tumorales (figura 10C y F). Estos hallazgos son concordantes con las observaciones realizadas en la RM, donde la reducción de la IS en el tejido tumoral parecía localizarse en la periferia de los implantes y en algunos focos dispersos intra-tumorales, mientras que la mayor mantenía constante la IS.

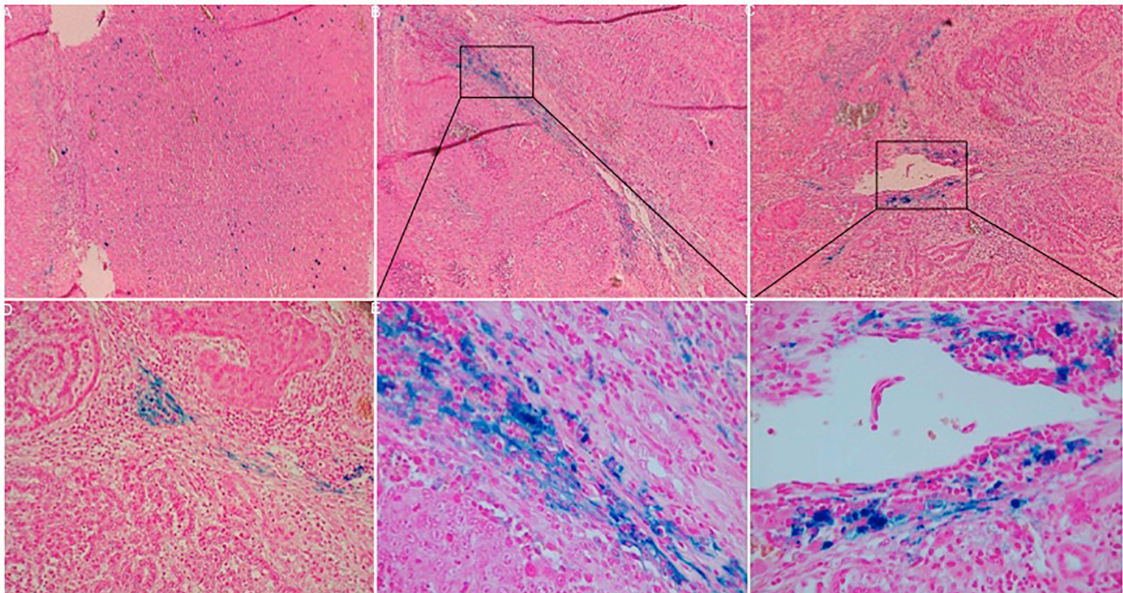


Figura 10.- Cortes histológicos con tinción de azul de Prusia del hígado de la rata 4R. Los depósitos de Fe adquieren tonalidad azul. A. Parénquima hepático con células de Kupffer teñidas de azul por los depósitos citoplasmáticos de Fe 100x. B. Depósitos de Fe en tejido fibrovascular presente entre implantes tumorales 100x. C, D, E y F depósitos de Fe en el intersticio fibrovascular circundante a estructuras glandulares tumorales, 100x, 200x, 400x, 400x (respectivamente).

Tomando en consideración todos estos datos, y con la finalidad de mejorar la afinidad selectiva de las MNp-RGD, es preciso encontrar un mecanismo para evitar que las MNp-RGD sean atrapadas por las células de Kupffer, bien inhibiendo específicamente su actividad (mediante compuestos de Cloruro de Gadolinio) o bien saturándolas de Fe con bajas tasas de absorción específica (SAR), administrado previamente a la infusión de las MNp-RGD.

6. Conclusiones

Las moléculas de RGD quedan adheridas a las células tumorales en cultivo tras una hora de exposición, alcanzando el máximo a las dos horas.

La fluorescencia detectada en las placas de cultivo sólo se localiza en células tumorales, y no se debe a adhesión a la placa.

Hemos de mejorar el porcentaje de células que se marcan con RGD-fluoresceína.

Las MNp-RGD funcionalizadas con RGD y estabilizadas para soportar un medio fisiológico, han demostrado un comportamiento satisfactorio, adhiriéndose al tejido tumoral.

Aunque el Fe ha resultado fagocitado por las células de Kupffer del hígado sano, las MNp-RGD también se han adherido selectivamente al espacio intersticial de los lechos tumorales.

La consecución de un depósito homogéneo intra-tumoral de MNp-RGD se presenta muy complicada, puesto que en general los nichos tumorales metastásicos son ambientes mal vascularizados. Sin embargo, si se consigue un depósito abundante de MNp-RGD en el tejido que circunda el árbol vascular tumoral y este sistema de aporte sanguíneo es destruido mediante hipertermia, la estrategia antitumoral también sería adecuada.

7. Bibliografía

1. Ballantyne GH, Quin J. Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71(12 Suppl): 4252-66.
2. Millikan KW, Staren ED, Doolas A. Invasive therapy of metastatic colorectal cancer to the liver. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 27-48.
3. Yoon SS, Tanabe KK. Surgical treatment and other regional treatments for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist* 1999; 4: 197-208.
4. Fernández FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM. Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg* 2004; 240: 438-47.
5. Silen W. Hepatic resection for metastases from colorectal carcinoma is of dubious value. *Arch Surg* 1989; 124: 1021-2.
6. Valls C, Ruiz S, Barrau V, Burdío F, Lladó L, Figueras J, Vilgrain V. Ablación por radiofrecuencia de tumores hepáticos. *Radiología* 2006; 48: 53-69.
7. Shiina S, Tagawa K, Niwa Y, Unuma T, Komatsu Y, Yoshiura K, Hamada E, Takahashi M, Shiratori Y, Terano A. Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma: results in 146 patients. *AJR* 1993; 160: 1023-8.
8. Lee MJ, Mueller PR, Dawson SL, Gazelle SG, Hahn PF, Goldberg MA, Boland GW. Percutaneous ethanol injection for the treatment of hepatic tumors: indications, mechanism of action, technique, and efficacy. *AJR* 1995; 164: 215-20.
9. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol* 2002; 80: 149-56.
10. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K. Microvasculature of small liver metastasis in rats. *J Surg Res* 2000; 94: 43-8.
11. Gillams AR, William RL. Five-year survival following radiofrequency ablation of small, solitary, hepatic colorectal metastases. *J Vasc Interv Radiol* 2008; 19: 712-7.
12. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation. *Surgery* 2006; 139: 73-81.
13. Maataoui A, Qian J, Vossoughi D, Khan MF, Oppermann E, Bechstein WO, Vogl TJ. Transarterial chemoembolization alone and in combination with other therapies: a comparative study in an animal HCC model. *Eur Radiol* 2005; 15: 127-33.
14. Maataoui A, Qian J, Mack MG, Khan MF, Oppermann E, Roozru M, Schmidt S, Bechstein WO, Vogl TJ. Liver metastases in rats: chemoembolization combined with interstitial laser ablation for treatment. *Radiology* 2005; 237: 479-84.
15. Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldofner N, Scholz Jordan AR, Loening SA, Wust P. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur Urol* 2007; 52: 1653-62.
16. Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study. *Inv Radiol* 2002; 37: 580-6.
17. Moroz P, Metcalf C, Gray BN. Histologic analysis of liver tissue following hepatic arterial infusion of ferromagnetic particles in a rabbit tumour model. *BioMetals* 2003; 16: 455-64.
18. Danhier F, et al. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. *Journal of Controlled Release* 2009; 140: 166-73.
19. Hynes R-O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Medicine* 2002; 8: 918-21.

20. Oyarbide J. Diseño, síntesis y estudio conformacional de ciclopéptidos β -lactámicos de tipo RGD [tesis doctoral]. UPV/EHU. 2010
21. Gilchrist RK, et al. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann. Surg* 1957 Oct; 146(4): 596-606.
22. Jordan A, et al. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial. *Int J Hyperthermia* 2007 May; 23(3): 315-23.
23. Nielsen OS, et al. Studies on fractionated hyperthermia in L1A2 tumour cells in vitro: response to multiple equal heat fractions. *Int J Hyperthermia* 1985 Apr-Jun; 1(2): 193-203.
24. Aizpurua JM et al. "Click" synthesis of nonsymmetrical bis (1,2,3-triazoles). *Org Lett* 2010; 12(7): 1584-7.
25. Chang PV, Prescher JA, Sletten EM, Baskin JM, Miller IA, Agard NJ, Lo A, Bertozzi CR. Copper-free click chemistry in living animals. *PNAS* 2010; 107(5): 1821-6.
26. Echevarria JJ, García-Alonso I, Palomares T, Herrero B, Nevado E, Pérez JA, Fernández-Ruanova B. Usefulness of ultrasonography in developing and monitoring an experimental model of tumour induction in rat liver. *European Congress of Radiology, ECR 11, Viena 3-7 Marzo, 2011*. DOI: 10.1594/ecr2011/C-0592
27. Echevarría-Uraga JJ et al. Administración intrarterial de un magnetofluido termoterapéutico en un modelo experimental de metástasis hepáticas. Estudio de distribución con RM y MS. *Radiología* 2012; 54(3): 251-9.