PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2017

MEMORIA DEL PROYECTO Nº SV-17-GIJÓN-1-13

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: Estudio preclínico de nuevas estrategias terapéuticas en glioblastoma humano: utilización de nanopartículas como nuevo método de transporte de melatonina para la valoración *in vitro* de su efecto antitumoral en glioblastoma

Investigador/a/es responsable/es: José Ángel García Díaz

Tfno: 985182410 E-mail: joseagd@uniovi.es

Otros investigadores: Laura Elbaile Viñuales (Dpto. de Física y miembro del IUTA), Carmen Rodríguez Sánchez (Dpto. de Morfología y Biología Celular), Vanesa Martín Fernández (Dpto. de Morfología y Biología Celular) y Francisco Javier García Alonso (Dpto. de Química Orgánica e Inorgánica)

Empresas o instituciones colaboradoras: Hospital de Jove y Dismed.

2. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL PROYECTO

2.1 Resumen ejecutivo

Básicamente el objetivo del proyecto durante este año era la fabricación de nanopartículas magnéticas (MNPs) recubiertas con un polímero que permita cargar la mayor concentración de melatonina (MEL) y el estudio magnético de las nanopartículas obtenidas. También se pretendía confirmar que las nanopartículas cargadas con melatonina presentaban un efecto en cultivos de células de glioma.

Durante este año se han fabricado MNPs de magnetita por dos métodos diferentes para ver cuál era el más adecuado para la obtención de las partículas con las propiedades que necesitábamos, tamaño del orden de 20 nm y que fuesen superparamagnéticas. Los métodos utilizados fueron la coprecipitatción y la descomposición térmica. La síntesis por coprecipitación se llevó a cabo mediante una variación del método descrito por Huang et *al*. [1] y se obtuvieron nanoparticulas de un tamaño del orden de 7 nm y con un comportamiento superparamagnético. Este tamaño resultaba algo pequeño para nuestras necesidades y por eso probamos a fabricar las MNPs por el método de la descomposición térmica. Para la realización de esta técnica se probó con dos disolventes: octadeceno y bencileter. Estos dos procesos se desarrollaron de acuerdo al procedimiento indicado por Goya et *al.* [2]. Los mejores resultados se obtuvieron con el último, ya que a pesar de que la utilización de octadeceno daba unas nanopartículas con un tamaño óptimo se observaba por difracción de rayos x la presencia de impurezas. La utilización de bencileter dio como resultado la presencia de menos impurezas. Con esta técnica se obtuvieron nanopartículas de un tamaño medio de 15 nm, un campo coercitivo de 9.4 Oe, una imanación de saturación de 47.58 emu/g y una imanación remanente de 0.191 emu/g. Estas nanopartículas presentan un tamaño y comportamiento magnético apto para la aplicación que les queremos dar de transportar la melatonina a los gliomas.

Posteriormente se procedió a la obtención de nanoparticulas recubiertas con polímero, en este sentido se obtuvieron nanopartículas recubiertas con acido poliacrílico, quitosano y un entrecruzamiento de quitosano con glutanaldehido. Para el recubrimiento con acido poliacrílico se utilizó una adaptación del protocolo desarrollado por Santra et al. [3] y el de Prijic *et al.* [4] y dado que con los dos los resultados eran buenos nos decantamos por seguir utilizando el segundo debido a su sencillez. Para el recubrimiento con quitosano y el entrecruzamiento de quitosano con glutanaldehido se siguió el protocolo descrito por Patil et *al.* [5].

1) Y. Huang, J. Gong, Q. Zhang, M. Hua, and J. Wu, "Synthesis and characterization of low molecular weight chitosan decorated Fe3O4 nanoparticles as T2 contrast agent," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 180, pp. 122–127, 2016.
2) V. M. Lenart, S. L. Gómez, M. P. Calatayud, and G. R. F. Goya, "Size and shape control of magnetite nanoparticles with a nonselective binding surfactants," *Soft Condensed Matter* arXiv:1402.1134 pp. 19–20, 2014.
3) S. Santra, C. Kaittanis, J. Grimm, and J. M. Perez, "Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging," *Small*, vol. 5, no. 16, pp. 1862–1868, 2009
4) S. Prijic *et al.*, "Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma," *Biomaterials*, vol. 33, no. 17, pp. 4379–4391, 2012.
5) R. M. Patil *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide/chitosan core/shells for hyperthermia application: Improved colloidal stability and biocompatibility," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 355, pp. 22–30, 2014.

2.2 Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

Los objetivos iniciales del proyecto eran tres:

- Desarrollar MNPs cargadas con MEL, formadas por un núcleo central de óxido de hierro y revestidas de un polímero a determinar (se ensayarán concretamente el quitosano y el polietilenglicol).
- Confirmar que las MNPs cargadas con MEL desarrolladas en el punto anterior, presentaban un efecto en cultivos de células de glioma, que fuese al menos igual, o incluso mejor, que el de MEL administrada en solución estándar.
- Estudiar el comportamiento magnético de las MNPs y evaluar los campos magnéticos necesarios para mantenerlas en reposo (contra el flujo sanguíneo) en la zona tumoral el tiempo durante el cual se estaría liberando el fármaco.

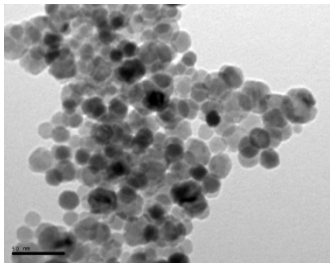
Como se puede observar comparando los objetivos con el resumen ejecutivo, dado que el proyecto estaba pensado para un año y se tuvo que realizar prácticamente en cuatro meses, no se pudieron conseguir todos los objetivos. Quedando por realizar el estudio del efecto de las MNPs cargadas con MEL sobre las células del glioma y la evaluación de los campos magnéticos necesarios para mantener en reposo las MNPs contra el flujo sanguíneo.

2.3 Tareas realizadas

- Síntesis de nanoparticulas magnéticas por dos procedimientos: coprecipitación y descomposición térmica.
- Recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con acido poliacrílico, quitosano y un entrecruzamiento de quitosano con glutanaldehido
- Caracterización magnética de las MNPs obtenidas

2.4 Resultados obtenidos

Como se indica en el resumen ejecutivo se han sintetizado nanopartículas por el método de coprecipitación y el de descomposición térmica. Los tamaños de las nanoparttículas son de unos 7 nm las obtenidas por el primer método y 17 nm para las obtenidas por el segundo, en ambos casos las nanoparticulas presentan un comportamiento superparamagnético. En la foto se pueden ver nanopartículas obtenidas por el método de descomposición térmica.



2.5 Trabajos o necesidades futuras

El presente proyecto se englobaba en un proyecto más ambicioso cuyo objetivo final era la síntesis de MNPs recubiertas por un polímero de los utilizados actualmente que sea el más adecuado para la carga de MEL y comprobar tanto en BCSCs de glioblastoma humano como en células del estroma tumoral que los efectos de MEL, administrada tanto individualmente como en combinación con TMZ, no se alteran por su unión a las MNPs. Finalmente se pretende realizar experimentos in vivo (modelo de ratón) –mediante inyección intracerebral de BCSCs, que inducen un tumor idéntico al humano del que proceden, y que por tanto es un modelo mucho más fiable que los realizados habitualmente con líneas celulares- que, de resultar positivos, permitirían el paso de esta combinación a ensayo clínico Fase I.

En el primer año que corresponde al proyecto que estamos informando los objetivos eran sintetizar MNPs recubiertas con el polímero que permita cargar una mayor concentración de melatonina y estudiar magnéticamente las MNPS obtenidas. Confirmar que las MNPs cargadas con MEL desarrolladas en el punto anterior, presentan un efecto en cultivos de células de glioma. También se pretende realizar simulaciones para determinar los campos magnéticos necesarios para mantener en reposo las nanoparticulas en un fluido con las características del flujo sanguíneo y aplicación “in vitro” de los resultados obtenidos.

De acuerdo con lo indicado anteriormente para terminar con el proyecto global se necesitaría cargar la melatonina en las nanopartículas y estudiar su efecto en las células tumorales. Por último quedaría el estudio de los campos magnéticos necesarios para mantener en reposos las MNPs en el flujo sanguíneo y realizar los experimentos en modelo ratón.

En la presente convocatoria pretendemos solicitar un nuevo proyecto para continuar con esta línea de trabajo.

2.6 Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias…)

Con los resultados obtenidos estamos terminando la elaboración de un trabajo de investigación para su envío a la revista Journal of Magnetism and Magnetic Materials.

Es importante indicar que durante el desarrollo del proyecto se puso en contacto con nosotros la empresa Nanovex Biotechecnologies para indicarnos su interés en las nanopartículas que estábamos fabricando. Este interés se añade al de las entidades que avalaban el proyecto (Hospital de Jove y Dismed).

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-17-GIJÓN-1.	3000 €			
Otras fuentes	Referencia proyecto/contrato	*GRUPIN 14-037* *GRUPIN 14-082*		2000 € 3500 €	1500 € 1500 €
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	Lucia Torres Sánchez			
	Tareas	Síntesis de nanopartículas magnéticas y su recubrimiento con distintos polímeros.			
	Período	01/09/2017 a 31/12/2017			

4. OTROS PROYECTOS Y CONTRATOS CON FINANCIACIÓN EXTERNA

Título del proyecto/contrato	
Referencia	
Investigador/a/es principal/es	
Equipo investigador	
Periodo de vigencia	
Entidad financiadora	
Cantidad subvencionada	