

## Combinación de una terapia enzimática con nanotecnología para el tratamiento del cáncer.

M. Fuentes<sup>1</sup>, P. García<sup>2</sup>, J.M. Sanz<sup>2</sup>, M.P. Ventero<sup>3</sup>, V.M. Barberá<sup>3</sup>, M. Saceda<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup> Estudiante de Doctorado. Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández, Elche, España. [mariafuentesbaile@gmail.com](mailto:mariafuentesbaile@gmail.com)

<sup>2</sup> Investigador. Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández, Elche, España.

<sup>3</sup> Unidad de investigación del Hospital General Universitario de Elche, FISABIO, Elche, España.

Las alternativas terapéuticas más utilizadas para el tratamiento del cáncer son la quimioterapia, la cirugía y la radioterapia, sin embargo, existen células tumorales resistentes a este tipo de terapias. El principal objetivo de nuestro laboratorio es la búsqueda de tratamientos alternativos para tumores quimiorresistentes, en concreto, estamos evaluando la posible combinación de una terapia enzimática basada en el uso de una enzima generadora de radicales libres, la D-aminoácido oxidasa (DAO), con la nanotecnología para el tratamiento de tumores. Las terapias enzimáticas se basan en dirigir una enzima exógena hacia el tumor y, a continuación, administrar de forma sistémica un profármaco no tóxico, que ha de ser sustrato de la enzima, para que pueda ser convertido en un fármaco anticancerígeno [1]. Así, una posible estrategia terapéutica sería una terapia enzimática basada en el uso de la DAO de *Rhodotorula gracilis* (EC 1.4.3.3). La flavoenzima DAO cataliza la oxidación de D-aminoácidos en los correspondientes alfa-cetoácidos, amonio y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [2]. La DAO de levaduras posee una actividad catalítica muy alta y presenta una interacción estable con el cofactor FAD (dinucleótido de flavina-adenina); además, su sustrato no está presente de forma endógena a altas concentraciones, permitiendo una regulación sencilla de la actividad de la enzima [3]. Esta enzima podría ser inmovilizada en nanopartículas, lo que permitiría la vehiculización de forma específica hacia el tumor, entre otras ventajas. La DAO utilizada en nuestro trabajo está funcionalizada con el polipéptido ClytA, que es el dominio C-terminal de unión a colina de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina (amidasa LYTA) sintetizada por *Streptococcus pneumoniae*. El dominio ClytA presenta una fuerte afinidad por la colina o análogos de la misma, como el dietilaminoetanol (DEAE) [4], lo que permitiría la inmovilización de la DAO en nanopartículas en cuya superficie hubiera DEAE. Concretamente, ya hemos optimizado la inmovilización de la DAO en nanopartículas magnéticas, cuyo interés radica en que pueden ser dirigidas de forma específica hacia el tumor mediante un campo magnético. Las nanopartículas magnéticas utilizadas tienen un tamaño de 200nm, están formadas por un núcleo de magnetita, una cubierta de almidón y han sido funcionalizadas con DEAE en la superficie. Ya hemos comprobado la efectividad de la DAO para generar muerte celular en líneas celulares procedentes de varios tipos de tumores como carcinoma de colon, de páncreas exocrino y glioblastoma. De este modo, hemos podido identificar tanto las líneas celulares sensibles como las resistentes a los efectos de la DAO, así como aquellas en las que el efecto es citoestático en lugar de citotóxico. De hecho, en algunas de las líneas tumorales resistentes a la muerte celular generada por la DAO hemos empezado a obtener resultados sobre los motivos de dichas resistencias, que están relacionados principalmente con la sobreexpresión de la catalasa y del factor de transcripción NF-κβ. También hemos empezado a estudiar el mecanismo por

el que la enzima genera su efecto sobre las células, que se basa fundamentalmente en la generación de radicales libres y el daño que generan en el ADN causando una muerte principalmente de tipo necrótica. Finalmente, hemos analizado el efecto de la enzima libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas, demostrando que al estar inmovilizada en estas nanopartículas se potencian tanto la estabilidad como el efecto de la enzima.

### Referencias

- [1] Niculescu-Duvaz, I. y Springer, C.J. (2005). Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 30, 71–88.
- [2] Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S. y Molla, G. (2007). Physiological functions of d-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* 64, 1373–1394.
- [3] Yoshikawa, T., Kokura, S., Tainaka, K., Naito, Y. y Kondo, M. (1995). A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res* 55, 1617–1620.
- [4] Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. y García, E. (1992). Immobilization and single- step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J Biochem* 203, p. 153-159.