



Modelado de nanovectores para el tratamiento del cáncer Modeling nanovectors for cancer treatment

H.I. Cruz-Luis ^{a,b,*}, M.T. Hernández-Huerta ^{b,c}, C. Romero-Díaz ^a, E. Pérez-Campos ^a,

L. Pérez-Campos M. ^b, A.D. Pérez-Santiago ^a

^a División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México, IT Oaxaca, 68030, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

^b Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, 68120, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

^c CONAHCYT, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, 68120, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

Resumen

La conjugación de nanoestructuras con moléculas bioactivas se emplea en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. La quercetina (QUE) es un flavonoide con efecto antioxidante que inhibe el estrés oxidativo y la viabilidad de células cancerosas. *Phaseolus lunatus* (PHA) es una lectina con afinidad a estructuras de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) por lo cual aglutina eritrocitos del grupo sanguíneo A. El objetivo de este trabajo fue modelar la interacción entre QUE, PHA con nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (NTCo) mediante docking y dinámica molecular, utilizando HEX6.3 y AMBER20. Se identificaron seis residuos de interacción entre PHA y el NTCo (F12-V114-N129-D217-D218-W219), por lo que no interfieren con los sitios de reconocimiento a GalNAc de la lectina ni con la unión de PHA con QUE. En conclusión, la implementación de nanovectores acoplados a QUE y PHA podría mejorar el efecto citotóxico sobre células cancerígenas.

Palabras Clave: Nanotubos de carbono, Docking, Dinámica molecular, Lectina, Cáncer.

Abstract

The conjugation of nanostructures with bioactive molecules is used for diagnosis and treatment of cancer. Quercetin (QUE) is a flavonoid with antioxidant effect that inhibits oxidative stress and viability of cancer cells. *Phaseolus lunatus* (PHA) is a lectin with affinity to N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) structures, thus agglutinates blood group A erythrocytes. The objective of this paper was to model the interaction between QUE, PHA with carbon nanotubes multiwalled carboxylic (CNTo) docking and dynamic molecular, using HEX6.3 and AMBER20. Six interactions residues were identified between PHA and CNTo (F12-V114-N129-D217-D218-W219), therefore not interfere with the recognition sites of GalNAc of the lectin nor with the union PHA with QUE. In conclusion, the implementation of nanovectors coupled to QUE and PHA could improve the cytotoxic effect on cancer cells.

Keywords: Carbon nanotubes, Docking, Molecular dynamic, Lectin, Cancer.

1. Introducción

Actualmente, se considera al cáncer como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, su incidencia va en aumento en la población, el número de casos nuevos equivale al doble de muertes por el cáncer, independientemente de edad, género o etnia (INEGI, 2023) (WHO, 2022) (NIH, 2020). El cáncer, considerado como el conjunto de enfermedades que afecta cualquier parte del

organismo al originarse células anormales o cancerosas caracterizadas por una proliferación descontrolada, resultado de alteraciones en el ADN. Estas mutaciones generan aglomerados celulares o tumores en el sitio de origen, capaces de diseminarse a través de la sangre o linfa para formar nuevos tumores en otras partes del cuerpo, proceso denominado metástasis. La metástasis es la principal causa de las muertes asociadas a cáncer (Jacob *et al.*, 2016) (Hayes and Lippman, 2018).

*Autor para la correspondencia: holanda.crz@gmail.com

Correo electrónico: holanda.crz@gmail.com (Holanda I. Cruz-Luis), mthernandez@conahcyt.mx (María T. Hernández-Huerta), carlos.romero@itoaxaca.edu.mx (Carlos Romero-Díaz), pcampos@itoaxaca.edu.mx (Eduardo Pérez-Campos), lperez.cat@uabjo.mx (Laura Pérez-Campos Mayoral), aperez_santiago@hotmail.com (Alma D. Pérez-Santiago).

Existen diferentes tratamientos para combatir el cáncer incluyendo quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, cirugía, fototerapia, terapia dirigida. Los esfuerzos actuales en la lucha contra el cáncer se dirigen a la búsqueda de tratamientos que puedan erradicar las células cancerosas provocando el menor daño sobre las células normales, o que puedan prevenir la metástasis.

El acoplamiento molecular (molecular docking), permite determinar energía de afinidad entre dos moléculas además de la estabilidad de la misma, obteniendo sitios de reconocimiento y las interacciones intermoleculares que se llevan a cabo; mientras que la dinámica molecular es la simulación de la interacción de átomos y moléculas en un periodo de tiempo (Hildebrand *et al.*, 2019) (Vidal-Limon *et al.*, 2022) (Wu *et al.*, 2022). Ambas técnicas teóricas son cada vez más utilizadas en biomedicina, por la gran utilidad en las predicciones para la fase experimental.

La conjugación de nanoestructuras es un área emergente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, se incluye el uso de nanoesferas poliméricas, nanocápsulas, nanoliposomas y nanoestructuras a base de carbono; las cuáles son modificadas y funcionalizadas con moléculas bioactivas para ser empleadas como nanotransportadores. Los nanotubos de carbono son materiales constituidos de láminas de grafeno, que constan de enlaces puros de carbono unidos entre sí por enlaces covalentes híbridos sp^2 . Estos nanomateriales pueden ser de pared simple o de pared múltiple, dependiendo de las propiedades que presentan, de las capas concéntricas, grado de enrollamiento y diámetro del mismo. (Baladrán-Quintana *et al.*, 2008) (O'Connell, 2006).

Las moléculas bioactivas que se acoplan a nanotubos de carbono incluyen lectinas, glicoproteínas con dominios de reconocimiento a carbohidratos que permiten la unión específica y reversible a monosacáridos u oligosacáridos (Fei Fang & Bun Ng, 2013) (Nascimento, y otros, 2012).

La expresión alterada de las glicoproteínas N-acetilgalactosamiladas existe en diversas neoplasias, por lo que la glicosilación es de importancia en la biología celular de diferentes tumores malignos (Broks *et al.*, 2001) (Suzuki, 2019). Muchas investigaciones se han centrado en las lectinas como sensores del nivel de glicosilación en una célula, distinguiendo de un tumor benigno y maligno (Clark and Mao, 2012) (Poiroux *et al.*, 2017) (Rodríguez *et al.*, 2020) (Reyes and Gallegos, 2011), siendo *Concanavalina A* la lectina más estudiada en esta área (Huldani *et al.*, 2022) y más reciente el género de *Phaseolus*. La lectina de *Phaseolus lunatus* (PHA) es un tetrámero proteico con subunidades de 31 kDa con afinidad a N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (Galbraith and Goldstein, 1970) (Gould and Scheinberg, 1970) (Roberts and Goldstein, 1983). Los sitios de interacción de PHA con GalNAc son las asparaginas N53, N82, N100, N129 y N205 (uniprot.org, code: p16300), se ha encontrado que la lectina PHA posee efecto antiproliferativo en células de cáncer (Wong and Ng, 2005) (Reynoso *et al.*, 2007) (Aguilar *et al.*, 2021).

Por otro lado, la quercetina (QUE) es un flavonol con efecto antioxidante y capacidad de inhibir la viabilidad de células cancerosas, se encuentra presente en cebollas, manzanas, chocolate, té negro, té verde, uva entre otros (Park, 2005), además de reportes de estudios *in vitro* acerca de sus propiedades anticancerígenas (Dajas, 2012) (Jakhar *et al.*, 2014). Existen estudios acerca de la síntesis de nanopartículas unidas a QUE (Baksi *et al.*, 2018) (Curcio *et al.*, 2012).

Daneshmehr (2015) ha calculado de forma teórica DFT (density functional theory) de la interacción de NTC de pared simple con quercetina, obteniendo un buen nanoportador. De igual manera, se han realizado estudios experimentales del nanocompuesto Q-PMMA-NTC (quercetina-ácido metacrílico, nanotubos de carbono de pared múltiple), en donde encontraron que la formación de este nanocompuesto incrementa la estabilidad de la QUE, y ser utilizado en terapia de cáncer (Cirillo *et al.*, 2013). Aunado a ello se ha cargado NTC de pared múltiple con quercetina y tamoxifen, incrementando la eficacia del fármaco y mejorando su biocompatibilidad (Kumar *et al.*, 2017).

Derivado de las propiedades que presentan la lectina PHA y QUE, el objetivo de este trabajo fue modelar la interacción entre PHA, QUE con nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados mediante docking y dinámica molecular, utilizando HEX6.3 y AMBER20 y obtener un nanocompuesto prometedor para el tratamiento del cáncer.

2. Metodología

Las estructuras tridimensionales de nanotubos de carbono, así como los campos de fuerza se obtuvieron de Vogele *et al.*, (2018) quien proporciona las estructuras en pdb, mol2 y frmod de los nanotubos de carbono en configuraciones zigzag y armchair; en longitudes de 40, 45, y 50 Å y un diámetro de 10 Å. El ángulo entre carbonos terminales es de 135° y entre carbonos de los anillos de 120°. La estructura de PHA y QUE fueron obtenidas de uniprot (uniprot.org, code: p16300) y pubchem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, code: 5280343), respectivamente. Se realizaron acoplamiento en HEX6.3 bajo los siguientes parámetros: correlation type: shape and electrostatics, post processing: MM minimization, grid dimension: 0.75, steric scan: 18 (correlación de electrostática y de forma, minimización, con una gradilla de 0.75 y una correlación estérica de 18). En primer lugar, usando HEX 6.3, se hizo el acoplamiento entre PHA y QUE, se obtuvieron las estructuras con la mayor energía de afinidad, las cuales fueron sometidas a dinámica molecular utilizando AMBER20 y AMBERTOOLS 20 bajo el siguiente proceso: 50000 pasos de minimización usando gradiente conjugado, 500,000 pasos de calentamiento de 0 a 300 °C usando el termostato de Langevin, 1.5 ns de equilibrio de densidad y 50 ns de producción de dinámica molecular; modelo de agua TIP3P y para las proteínas los campos de fuerza ff19SB de Amber. Posteriormente se obtuvo la energía de afinidad usando los métodos MMGBSA (Molecular Mechanics Generalized Born) y MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson Boltzman Surface Area) con la finalidad de corroborar las energías de afinidad obtenidas durante el proceso de acoplamiento. Este mismo proceso se realizó para PHA y los nanotubos de carbono, Figura 1. Cabe señalar que en el acoplamiento entre PHA y los nanotubos de carbono se utilizaron los nanotubos de todas las longitudes en ambas configuraciones, armchair y zigzag, y al obtenerse interacción en el mismo sitio en la lectina PHA, se decidió hacer solo la dinámica molecular de la estructura correspondiente a PHA con el nanotubo de carbono de 40 Å en configuración armchair. Por otro lado, se construyeron nanotubos de carbono de cuatro capas obteniéndose interacción con PHA en el mismo sitio.

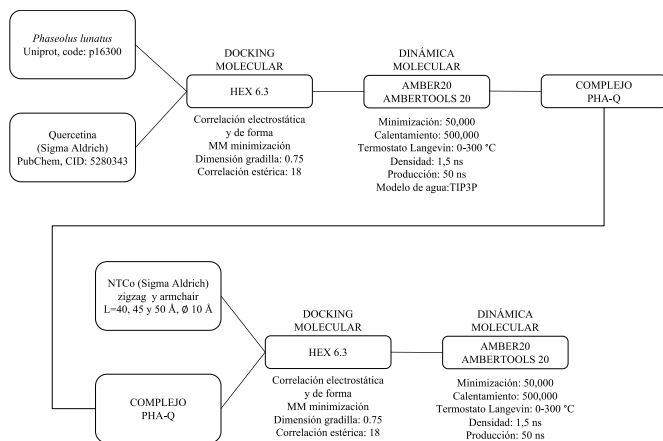


Figura 1: Diagrama de flujo, metodología empleada para el acoplamiento y dinámica molecular, incluyendo los parámetros utilizados en HEX6.3 y AMBER20.

3. Resultados

Las dimensiones de la lectina de PHA corresponden a 90 Å * 42 Å, y de acuerdo con el acoplamiento, la longitud de la molécula que entra en contacto con el nanotubo fue de aproximadamente 36 Å.

La interacción entre PHA y QUE tiene lugar en la región de los siguientes aminoácidos F138, N133, D134, I135, L138, L161 K214, mismos que no interfieren los sitios de interacción con el carbohidrato GalNAc, Figura 2 y 3.

Los sitios de interacción que tuvieron las moléculas, con ambos tipos de nanotubo de carbono fueron en fenilalanina F12, valina V114, asparagina N129, ácido aspártico D217 y D218, triptófano W219 (F12-V114-N129-D217-D218-W219), en estos sitios no se muestra comprometido el reconocimiento a GalNAc de la lectina PHA, Figura 4.

El acoplamiento mediante HEX6.3 se realizó con dos diferentes tipos de NTC, armchair y zigzag y tres diferentes longitudes, Figura 5 y 6, en donde se observó que la interacción ocurre en el mismo sitio de la lectina PHA, por lo que la dinámica molecular se realizó con un NTC de 40 Å de longitud, en configuración armchair.

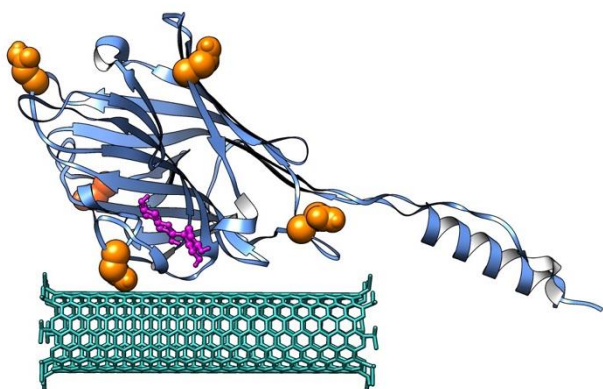


Figura 2: Vista general de la lectina PHA (ribbons, conformer blue), QUE (ball and sticks, magenta), NTC (sticks, light sea green) y sitios de interacción de la lectina con GalNAc (spheres, orange). Se puede apreciar que ninguno de los sitios de interacción de las distintas moléculas no interfieren entre sí.

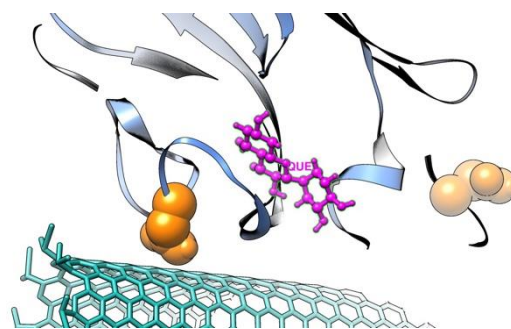


Figura 3: QUE en foco (ball and sticks, magenta), se muestra que no tiene interferencia con ningún otro aminoácido de interés o con el NTC.

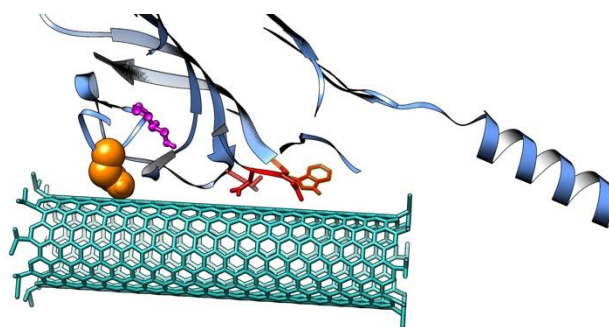


Figura 4: NTC (sticks, light sea green), interactuando con Residuos de PHA (sticks, red).

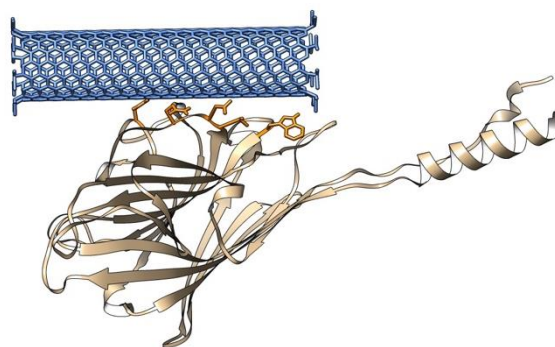


Figura 5: Interacción molecular NTCo-PHA-Q; NTC de tipo zigzag (sticks, light blue), PHA-Q (ribbons, conformer sepia).

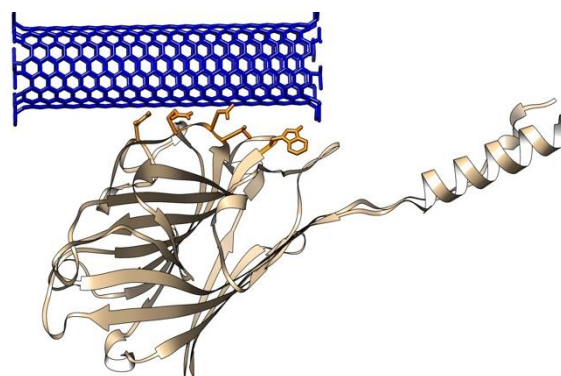


Figura 6: Interacción molecular NTCo-PHA-Q; NTC de tipo armchair (sticks, purple), PHA-Q (ribbons, conformer sepia).

Las estructuras con mayor afinidad obtenidas en HEX6.3, que fueron sometidas a dinámica molecular y cuya energía de interacción comprobada por los métodos de Mecánica Molecular Generalizada de Born y Mecánica Molecular de Área de Superficie de Poisson Boltzman, muestran que la interacción entre la lectina PHA y los nanotubos de carbono presentan energías similares, -47 kcal/mol usando HEX 6.3 y -69 kcal/mol usando los métodos MMPBSA y MMGBSA, Tabla 1.

Tabla 1: Sitios y energías de interacción entre la lectina PHA y el nanotubo de carbono de 40 Å de una sola capa. En la columna 2 y 3 se muestran las energías calculadas por HEX 6.3 y por los métodos MMGBSA y MMPBSA, respectivamente.

Residuos	Energía de unión de afinidad más alta, HEX 6.3 (Kcal/mol)	Energía de unión de afinidad, métodos MMGBSA/MMPBSA (Kcal/mol)
F12, V114, N129, D217, D218 y W219	-47.49	-69.74 / -69.84

4. Conclusiones

La incorporación de métodos de cómputo, como en el caso del acoplamiento y dinámica molecular ha abierto la posibilidad de incrementar la probabilidad de éxito en el área experimental. La energía de unión de afinidad reportada con HEX6.3 es sustentada con los valores de energía obtenidos con AMBER20, por ambos métodos (MMGBSA y MMPBSA); nuestros resultados demuestran que la funcionalización de ambas moléculas a un nanomaterial que no comprometa los sitios de interacción de la lectina PHA, puede dirigir el nanocompuesto a la célula diana. Además, podemos resaltar que la interacción entre PHA y nanotubos, es independiente de la longitud, configuración (armchair y zigzag), tipo de pared (simple o multipared) de los NTC. Por lo que, sugerimos que la implementación de nanovectores acoplados a QUE y PHA podría ser una alternativa de tratamiento para mejorar el efecto citotóxico sobre células cancerígenas, dado que la unión de las biomoléculas al nanotubo de carbono no solo conservaría las propiedades de las mismas, sino que las potencializaría, como se ha reportado en estudios previos.

Agradecimientos

Agradecemos al CONAHCYT por el apoyo económico brindado a HICL para los estudios de Doctorado en TNM-ITO con la beca No. 746198.

Referencias

- Aguilar, J., Pina, M., Gochi, Y., Pérez, A., (2021). Efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama y cervico-uterino causado por nanotubos de carbono multipared-lectina de Phaseolus lunatus var silvester Baudet. *Rev Biomédica*, 32(2), 87-98.
- Baksi, R., Pratap, D., Borse, S., Rana, R., Sharma, V., Nivsarkar, M. (2018). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1513-1526.
- Baladrán-Quintana, R., Romero-Villegas, G., Mendoza-Wilson, A., Sotelo-Mundo, R. (2008). Nanotubos de carbono y bionanotecnología. *Interciencia*, 33, 331-336.
- Broks, S., Hall, D., Buley, I. (2001) GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. *British J. of Cancer*, 85(7), 1014-1022.
- Cirillo, G., Vittorio, O., Hampel, S., Iemma, F., Parchi, P., Cecchini, M., Puoci, F., Picci, N. (2013) Quercetin nanocomposite as novel anticancer therapeutic: improved efficiency and reduced toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 359-365.
- Clark, D., Mao, L. (2012) Cancer biomarker discovery: lectin-based strategies targeting glycoproteins. *Dis Markers*, 33, 1-10.
- Curcio, M., Cirillo, G., Parisi, O., Iemma, F., Picci, N., Puoci, F. (2012) Quercetin-Imprinted nanospheres as novel drug delivery devices. *J Funct Biomaterials*, 3, 269-282.
- Dajas, F., (2012) Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol.*, 143, 383-396.
- Daneshmehr, S. (2015). Carbon nanotubes for delivery of quercetin as anticancer drug: Theoretical study. *Procedia Materials Science*, 11, 131-136.
- Fei Fang, E., Bun Ng, T. (2013). *Antitumor Potential and Other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*. Springer.
- Galbraith, W., & Goldstein, I. (1970). Phytohemagglutinins: A new class of metalloproteins. Isolation, purification, and some properties of the lectin from Phaseolus lunatus. *Febs Letters*, 9(4), 197-201.
- Gould, N., & Scheinberg, S. (1970). Isolation and Partial Characterization of Two Anti-A Hemagglutinins from P. lunatus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 137(1), 1-11.
- Hayes, D., & Lippman, M. (2018). Cáncer de mama. In: Jameson, J., Kasper, D., Longo, D., Fauci, A., Hauser, S., Loscalzo, J., (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna (20e ed.)*. McGraw Hill.
- Hildebrand, P., Rose, A., Tiemann, J. (2019). Bringing molecular dynamics simulation data into view. *Trends Biochem Science*, 44(11), 902-913.
- Huldani, H., Rashid, A., Turaev, K., Opulencia, M., Abdelbasset, W., Bokov, D., Mustafa, Y., Al-Gazally, M., Hammid, A., Kadhim, M., Ahmadi, S. (2022) Concanavalin A as a promising lectin-based anti-cancer agent: the molecular mechanisms and therapeutic potential. *Cell Commun Signal*, 20 (1), 167.
- INEGI (2023). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
- Jacob, M., Varghese, J., Murray, R. K., Weil, P. A., (2016). Cáncer: una perspectiva general. In: Rodwell, V., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Weil, A., (Eds), *Harper. Bioquímica ilustrada (30a ed.)*. McGraw Hill, Mx, pp. 721-725.
- Jakhar, R., Paul, S., Park, Y., Han, J., Kang, S. (2014). Pentamethoxyflavone, a quercetin derivate protects DNA from oxidative challenges: Potential mechanism of action. *J Photochem Photobio B*, 131, 96-103.
- Kumar, M., Sharma, G., Misra, C., Kumar, R., Singh, B., Katara, O., Raza, K. (2017) N-desmethyl tamoxifen and quercetin-loaded multiwalled CNTs: A synergistic approach to overcome MDR in cancer cells. *Materials Science & Eng*, 89, 274-282.
- Nascimento, K. S., Cunha, A. I., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Azevedo, A. M., Aires-Barros, M. R. (2012). An overview of lectins purification strategies. *Journal of Molecular Recognition*, 25, 527-541.
- NIH (2020). El cáncer. *Naturaleza del cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza>
- O'Connell, M. (2006). *Carbon Nanotubes: Properties and Applications (1st ed.)*. M. O'Connell, (Ed.) US: Taylor & Francis Group
- Park, J. (2005). Quercetin. In: Coates, P., Betz, J., Blackman, M., Cragg, G., Levine, M., Moss, J., White, J., (Eds), *Encyclopedia of Dietary Supplements (2a ed.)*. Informa Healthcare, USA, pp. 656-664.
- Poiroux, G., Barre, A., Van Damme, E. J., Benoist, H., Rougé, P. (2017) Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1232.
- Reyes, B., Gallegos, R. (2011). Lectinas Vegetales: Una Alternativa terapéutica para el cáncer. *Desarrollo Cientif Enferm*, 19(5), 179-182.

- Reynoso, R., Ríos, M., Torres, I., Acosta, J., Palomino, A., Ramos, M., González, E., Guzmán, S. (2007). El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agricultura Tec Mex*, 33(1).
- Roberts, D., Goldstein, I. (1983). Adenine Binding Sites of the Lectin from Lima Beans (*Phaseolus lunatus*). *The Journal of Biological Chemistry*, 258(22), 13820-13824.
- Rodrigues, N., Natoli, M., Zippelius, A., Läubli, H., (2020) Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 8(2), e001222.
- Suzuki, O. (2019) Glicosilación en el linfoma: Biología y glicoterapia. *Pathol Int*, 69(8), 441-449.
- Vidal-Limon, A., Aguilar-Toalá, J., Liceaga, A. (2022). Integration of molecular docking analysis and molecular dynamics simulations for studying food proteins and bioactive peptides. *J Agric Food Chem*, 70(4), 934-943.
- Vögele, M., Köfinger, J., Hummer, G. (2018). Molecular dynamics simulations of carbon nanotube porins in lipid bilayers. *Faraday discussions*, 209, 341–358.
- Wong, J., Ng, T. (2005). Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus L.*). *Peptides*, 26 (11), 2086-2092.
- WHO (2022). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>
- Wu, X., Xu, L., Li, E., Dong, G. (2022) Application of molecular dynamics simulation in biomedicine. *Chem Biol Drug Des*, 99(5), 789-800