

Termoablación selectiva de células cancerígenas a través de nanopartículas magnéticas bioconjugadas y radiofrecuencia: estudio de viabilidad *in vitro*

Cap. 1/o. I.C.E. César Antonio **González-Díaz,*** Tte. Q.B. Pascual Francisco **Lucio-Monter,*** Tte. Q.B. Jesús Gabriel **Silva-Escobedo,*** Mayor M.C. Dolores Javier **Sánchez-González,**** Tte. A.M.G. Oscar **Serralde-Mexicano,***** Cor. M.C. Jesús Javier **Torres-Salazar,****** Q.F.B. Wendy Juana **Aguilera-Caldera,******* Tte. Cor. M.C. Sergio **Martínez-Salas***

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.
Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Áreas de Bioingeniería e Inmunología.

RESUMEN

Introducción. En México, los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general. El tratamiento de cáncer con radiofrecuencia (RF) está orientado a eliminar el tumor conservando el tejido sano. La efectividad del proceso ablativo por RF está asociada a la potencial capacidad de focalizar la energía electromagnética en la región tumoral.

Objetivo. Describir los resultados preliminares del desarrollo y evaluación de una técnica no invasiva de ablación selectiva de células cancerígenas a través de RF.

Material y métodos. Se realizaron simulaciones por computadora de la exposición a RF de tejido tumoral con concentraciones de nanopartículas magnéticas. Se marcaron células cancerígenas *in vitro* con nanopartículas magnéticas y se expusieron a la influencia de RF. La efectividad de la técnica como procedimiento ablativo focalizado se evaluó a través de la observación de viabilidad celular con respecto a células cancerígenas sin marcar. La simulación por computadora mostró la pertinencia de la técnica para focalizar la energía en la región tumoral.

Resultados. Los resultados experimentales indican que el protocolo de acoplamiento empleado es adecuado para marcar células cancerígenas. La viabilidad de las células tumorales marcadas con nanopartículas magnéticas disminuyó con respecto a las células tumorales sin marcar.

Selective thermoablation of carcinogenic cells across magnetic nanoparticles bioconjugate and radiofrequency: study of in vitro viability

SUMMARY

Introduction. In Mexico, malignant tumors represent the second cause of mortality in the general population. The cancer treatment by radiofrequency (RF) is focused on tumor destruction preserving healthy tissue. The effectivity of the RF ablativo process is associated to its potential capacity to concentrate the electromagnetic energy in the tumoral region.

Objective. To describe preliminary results of the development and evaluation of a non invasive technique focused on the selective ablation of tumoral cells by RF.

Material and methods. Computer simulations of tumoral tissue with magnetic nanoparticles exposed to RF were developed. Tumoral cells *in vitro* previously marked with magnetic nanoparticles were exposed to RF. The effectivity of the technique as a selective ablativo procedure was evaluated by viability studies; viability of unmarked tumoral cells was taken as reference value. The simulation study showed the pertinence of the technique to concentrate the energy in the tumoral region.

Results. The experimental results suggest that the used protocol for nanoparticles coupling is suitable to mark tumoral cells. After the RF exposition, the viability of marked tumoral cells with magnetic nanoparticles decreased with respect to unmarked cells.

* Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Subsección de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar. *** Área de Metalografía y Microscopía Electrónica del Laboratorio Central de Pruebas. Dirección General de Industria Militar. **** Jefe del Servicio de Urología del Hospital Central Militar. ***** Sección de Hematología Especial. Laboratorio Clínico. Unidad Médica de Alta Especialidad "Gaudencio González Garza". Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.

Correspondencia:

Cap 1/o. I.C.E. César Antonio González-Díaz

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cda. de Palomas s/n esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo electrónico: c.cesar.gonzalez@gmail.com

Recibido: Abril 8, 2008.

Aceptado: Junio 27, 2008.

Conclusión. Los resultados teóricos y experimentales sostienen el valor potencial de la propuesta técnica como método no invasivo para la ablación focalizada de cáncer a través de RF.

Palabras clave: termoablación, radiofrecuencia, cáncer.

Conclusion. The theoretical and experimental findings support the potential value of the technical proposal as a selective and non invasive ablative method for cancer treatment by radiofrequency.

Key words: Thermoablation, radiofrequency, cancer.

Introducción

Tumores malignos en órganos y tejidos como: mama, útero, próstata, tráquea, pulmón, estómago, hígado y cerebro están considerados dentro de las principales causas de mortalidad general.¹ En México, los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general y en mujeres mayores de los 25 años representa la primera.²

Recientes tratamientos contra el cáncer se basan en tecnologías tales como crioablación y ablación por radiofrecuencia (RF). La crioablación se ha estudiado como uno de los mejores procedimientos ablativos y los estudios clínicos han mostrado resultados prometedores asociados a un buen perfil de seguridad. Sin embargo, son necesarios estudios a largo plazo para determinar los mejores criterios de selección y confirmar resultados de largo plazo en comparación con técnicas quirúrgicas convencionales.³

Dentro de los procedimientos coadyuvantes que han cobrado relevancia en los últimos años para la destrucción focal de tumores cancerígenos en general se encuentra la ablación percutánea de imagen dirigida con RF. Dentro de las ventajas que ofrece esta técnica se encuentran la posibilidad de evitar la cirugía radical, disminución de la morbilidad, terapia del paciente no internado y la capacidad de tratar a candidatos quirúrgicos con pobre pronóstico.

El tratamiento de cáncer con RF está orientado a eliminar el tumor conservando el tejido sano. La técnica consiste en colocar un electrodo especial directamente en el tumor. La aplicación de corrientes alternas de RF produce una fricción resistiva en el tejido que es convertida en calor.⁴ El calor induce destrucción celular y desnaturalización de proteínas a temperaturas superiores a los 50 °C cuando se aplica por periodos de 4 a 6 min y destrucción casi instantánea cuando la temperatura es mayor a los 60 °C.⁵ Un sistema de RF emite una microonda capaz de quemar la masa cancerígena y eliminarla. Los especialistas monitorizan el proceso a través de técnicas de imagenología que permiten insertar el electrodo en el lugar correcto.

Los resultados hasta ahora encontrados reportan que el éxito del proceso ablativo por RF depende en gran medida del tamaño y ubicación del tumor. Entre los pacientes candidatos a este tratamiento se encuentran aquellos cuyos tumores son inferiores a 3 cm de diámetro.⁴⁻¹⁰ Tumores extendidos no ofrecen probabilidades atractivas de éxito a un procedimiento ablativo,⁴ lo cual refleja en parte las limitaciones biofisiológicas *in vivo* impuestas por el enfriamiento vascular mediado por perfusión, lo cual a su vez limita la necrosis inducida por calor.¹¹⁻¹³

Horkan C y cols. demostraron que agentes como el trióxido de arsénico pueden reducir el flujo sanguíneo a tumores inducidos (44-16%) e incrementar significativamente la coagulación inducida por RF.¹⁴ Los resultados obtenidos en un modelo experimental de tumor renal en conejo sugieren que la modulación farmacológica del flujo sanguíneo al tumor puede representar una alternativa de tratamiento focalizado mediante ablación térmica por RF, lo cual ofrece una posibilidad de tratamiento no invasivo a tumores renales malignos grandes y centralmente localizados.

Recientemente se estudió la posibilidad de inducir hipertermia intersticial basado en la excitación de dos tipos de nanopartículas superparamagnéticas biocompatibles (óxido de hierro recubiertas con dextran o aminosilano). Durante el estudio se inyectó el material superparamagnético en tumores inducidos en cerebro de rata, posteriormente fueron expuestos a campos magnéticos oscilantes (0-18 kA/m; 100 kHz). Los resultados demostraron la viabilidad de utilizar termoablación por RF focalizada para el tratamiento de cáncer en cerebro.¹⁵

Hilger I y cols. reportaron el efecto de la temperatura en la muerte celular de adenocarcinomas humanos implantados en ratones. Calentamiento por magnetismo fue inducido mediante la inyección de material magnético en el tumor (7 ± 3 mg de magnetita) y la exposición a campos magnéticos oscilantes (8.8 kA/m; 400 kHz). El estudio indica un aparente umbral de temperatura en el que el daño al ADN de células tumorales es irreversible.¹⁶

Aun cuando se han observado los potenciales beneficios del proceso ablativo por RF para el tratamiento de carcinomas, la técnica aún presenta limitaciones asociadas a la localización y dimensión del tumor objetivo. Los datos muestran un 90% de eficacia para tumores menores de 3 cm, la eficacia es mucho menor para lesiones de 3 a 5 cm y, en general, la ablación de lesiones mayores de 4 o 5 cm no se recomienda y los pacientes son considerados para resección quirúrgica. Además, siempre que los tumores están localizados en áreas de vasculatura importante no pueden ser tratados con certeza debido a las limitaciones impuestas por la reperusión mediada por la recirculación vascular.

En general, la efectividad del proceso ablativo por RF de neoplasias cancerígenas parece estar asociada a la potencial capacidad de focalizar la energía electromagnética en una región específica. Hasta donde conocemos, actualmente no existe una técnica que permita realizar el proceso ablativo de manera selectiva en células cancerígenas conservando la viabilidad de células sanas.

Nuestro grupo de investigación propone desarrollar una tecnología orientada a la destrucción selectiva y no invasiva

de neoplasias malignas a través de un proceso ablativo por RF. La técnica consiste en marcar células tumorales malignas con nanopartículas magnéticas unidas a un anticuerpo monoclonal específico (de ahí su naturaleza de nanopartícula bioconjugada), el cual reconoce antígenos característicos en la membrana de las células cancerígenas blanco. Nuestra hipótesis de estudio considera que las células cancerígenas marcadas con nanopartículas ferromagnéticas al ser sometidas a la influencia de campos electromagnéticos oscilantes en el rango de las microondas presentan la inducción selectiva de corrientes eléctricas. La intensidad del campo eléctrico generado por dichas corrientes se disipa en energía calorífica manifestándose como un proceso ablativo focalizado, lo cual permite conservar la viabilidad de células sanas.

El presente reporte describe resultados preliminares del desarrollo y evaluación de una técnica no invasiva de ablación selectiva por RF de células cancerígenas. Se reportan estudios teóricos que comprenden simulaciones por computadora del efecto ablativo por RF en tejido tumoral con concentraciones de nanopartículas ferromagnéticas, así como estudios experimentales que consisten en el marcado de células cancerígenas *in vitro* con nanopartículas magnéticas y anticuerpos monoclonales específicos, posteriormente la exposición de dichas células a la influencia de campos electromagnéticos oscilantes en el rango de frecuencias de las microondas. La técnica comprende el diseño de un equipo generador de RF adaptado para radiar direccionalmente muestras de células *in vitro*. La evaluación experimental de la tecnología consiste en determinar la efectividad de la técnica como procedimiento ablativo a través de la observación de viabilidad celular.

La visión futurista de aplicación clínica de la presente propuesta consiste en la infusión endovenosa de nanopartículas magnéticas unidas a un ligando cuya especificidad sea característica de un receptor dado en la superficie de células blanco. Posteriormente radiar la región tumoral con RF e inducir un proceso ablativo focalizado en las células marcadas con nanopartículas magnéticas.

Material y métodos

Modelación biofísica y simulación por computadora

Con el fin de evaluar teóricamente la viabilidad de la técnica propuesta como un proceso ablativo selectivo, se estimaron los efectos de biodegradación que la intensidad y frecuencia de campos electromagnéticos en el rango de las microondas ejercen en un modelo biofísico propuesto con y sin la influencia de partículas magnéticas. Se diseñó un modelo biofísico ideal de tejido renal sano y tumoral con partículas ferromagnéticas (concentraciones de Fe). Se simuló por computadora un campo magnético de alta intensidad y frecuencia al interior de la muestra tejido-partículas magnéticas, las propiedades eléctricas de tejido sano y tumoral fueron adaptadas de la literatura. El modelo biofísico y la simulación se realizó a través de la técnica de modelación multifísica por elemento finito utilizando los módulos electromagnéticos y de transferencia de calor del software FEMLAB (Comsol Multiphysics®); se calcularon y representaron las distribuciones de las líneas de flujo magnético, así como el gradiente de temperatura en el tejido con y sin la presencia de partículas magnéticas influida por la presencia del campo magnético. La *figura 1* representa el modelo biofísico simulado de tejido sano y tumo-

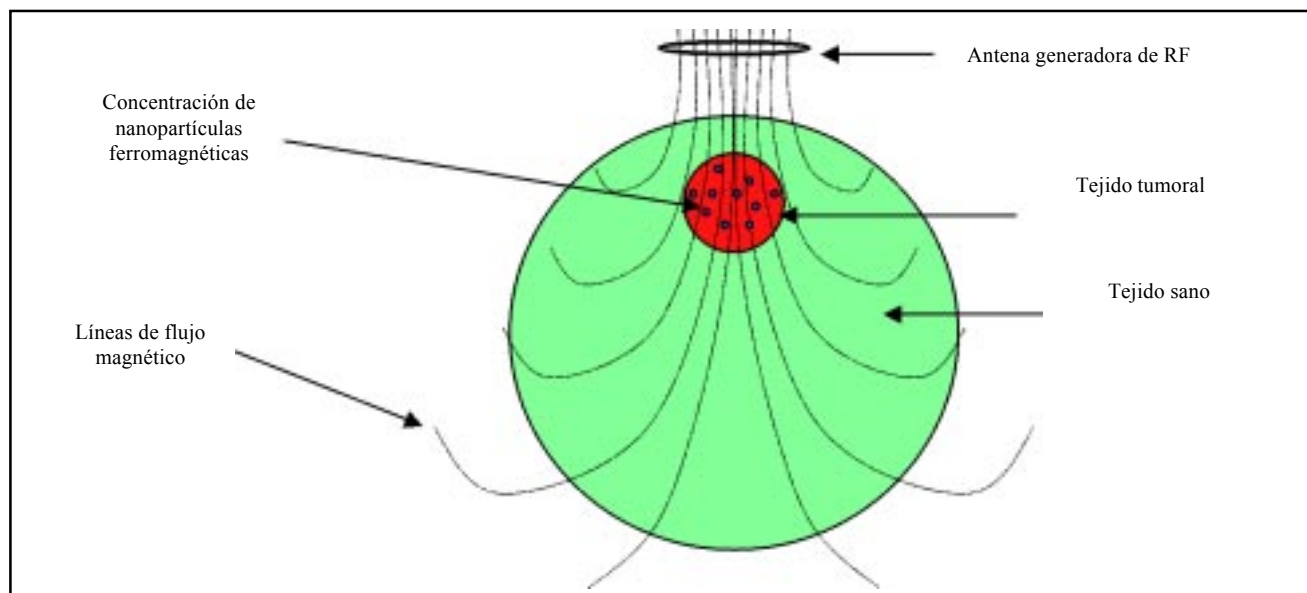


Figura 1. Modelo biofísico de tejido sano y tumoral con concentraciones de partículas ferromagnéticas distribuidas aleatoriamente en la región del tejido tumoral. La muestra tejido-partículas ferromagnéticas es influida por la presencia de un campo magnético de alta intensidad y frecuencia.

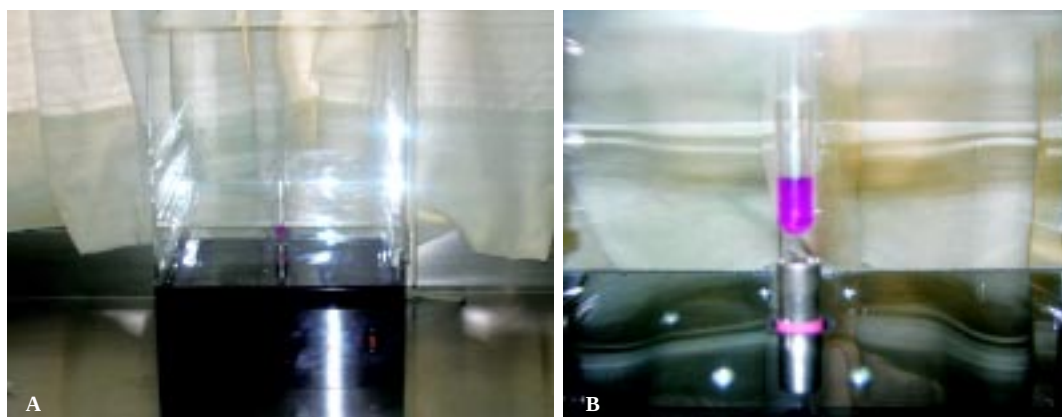


Figura 2. Apariencia física de la cámara de exposición a radiofrecuencia para cultivos celulares. **A)** Cámara completa con espacio suficiente para futuras experimentaciones en especies menores. **B)** Antena radiadora con tubo de ensayo que contiene 1 mL de medio de cultivo.

ral con concentraciones de partículas ferromagnéticas distribuidas aleatoriamente en la región del tejido tumoral. La muestra de tejido-partículas ferromagnéticas es influida por la presencia de un campo magnético de alta intensidad y frecuencia.

Instrumentación biomédica

Se diseñó una cámara de exposición a RF para cultivos celulares (con opción de utilizarse en especies menores de experimentación biomédica). El diseño consistió en la adaptación de un generador de microondas de tipo industrial (Magnetron - Marca: Daewoo, Modelo 2M218 JF, 2.45GHz a 1KW) a una cámara de acrílico cúbica expresamente diseñada para alojar tubos de ensayo de 45 mm de longitud por 10 mm de diámetro. El diseño del sistema contempla que en los citados tubos de ensayo se pueda depositar un volumen aproximado de 1 mL de células en suspensión para ser sometidas a radiación de RF. El sistema se adaptó para que la antena radiara directamente en la parte inferior del tubo de ensayo. La *figura 2* ilustra la apariencia de la cámara de exposición a RF para cultivos celulares.

Establecimiento del modelo *in vitro*

Células renales cancerígenas. Se estableció un modelo *in vitro* de células cancerígenas renales en cultivos primarios. Muestras de tejido, provenientes de riñón humano (extraídas por nefrectomía radical en el Hospital Central Militar) fueron procesadas entre 20 y 30 min después de que fue extraído el órgano; se tomaron porciones entre 2 y 3 cm³ o aproximadamente 15 g de tejido tumoral y tejido sano por separado; como medio de transporte se utilizó solución de fosfatos y boratos 1% (PBS). La *figura 3* muestra el procedimiento de obtención de biopsias de tejido renal sano y tumoral a través de nefrectomía radical realizada en el Hospital Central Militar.

Posterior a la toma de biopsias, las muestras fueron segregadas en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar y se tamizó con 20 mL de medio de cultivo para recuperar las células; después de separar las células de las impurezas de tejido fueron colocadas en botellas de 250 µL, para establecer el cultivo con 10 mL de medio de cul-

tivo D-MEM (Gibco BRL) enriquecido con suero fetal de bovino (decomplementado) al 30% y una mezcla de antibiótico de anfotericina, gentamicina y amikacina, los cultivos permanecieron a 37 °C de temperatura y 5% de CO₂, por 24 horas y después de este tiempo se cambió el porcentaje del suero al 10% y cada tres días se cambió el medio para expandir y formar la monocapa de células.

Células de leucemia. Se utilizaron células de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) procedentes del Centro Médico Nacional "La Raza" (IMSS), México, D.F., las cuales se obtuvieron mediante aspirado de médula ósea. Estas muestras fueron inicialmente empleadas para la inmunotipificación por citometría de flujo y posteriormente se emplearon en nuestro laboratorio como un control positivo.

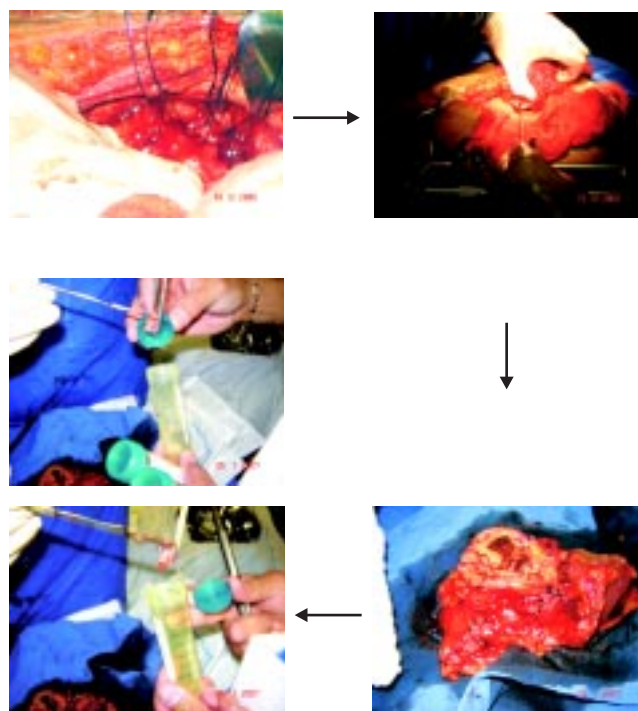


Figura 3. Procedimiento de obtención de biopsias de tejido renal sano y tumoral a través de nefrectomía radical realizada en el Hospital Central Militar.

Las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD10 conjugado con Fluoresceína (FITC) y posteriormente se acoplaron a las nanopartículas magnéticas. Un análisis de microscopia confocal se utilizó para demostrar la funcionalidad y especificidad del anticuerpo conjugado a la nanopartícula.

Inmunotipificación celular

Una vez establecido el cultivo primario de las células de carcinoma renal se realizó la tipificación de las células mediante la técnica de citometría de flujo. Dicha técnica emplea una marca fluorescente FITC acoplada a un anticuerpo monoclonal (anti-CD10), el cual se une a la membrana de células cancerígenas, lo que permite identificar de manera específica la población de células tumorales en cada cultivo establecido. Para el estudio nos apoyamos con el equipo de citometría de flujo, modelo FacsCalibur (Becton Dickinson, San José California, USA) utilizando el programa Cell-Quest. El equipo se encuentra ubicado en la Sección de Hematología Especial del Laboratorio Clínico de la Unidad Médica de Alta Especialidad “Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”.

Acoplamiento nanopartículas-anticuerpo

Las nanopartículas magnéticas que se utilizaron en este estudio fueron del tipo fluidMAG-ARA (Chemicell GmbH, Berlín, Alemania) cuyo diámetro aproximado es de 300 nanómetros y poseen una propiedad superparamagnética. Las nanopartículas tienen un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas de un polisacárido con grupos funcionales carboxilo. El ligando del bioconjugado corresponde al anticuerpo monoclonal anti-CD10, el cual contiene un grupo funcional amino; ambos grupos funcionales son activados por medio de carbodimida. La carbodimida reacciona con los grupos

carboxilos de las perlas magnéticas para producir derivados altamente reactivos de la O-acilurea y enseguida reaccionar rápidamente con los grupos amino del ligando. La reacción genera un enlace covalente que garantiza el acoplamiento estable de la nanopartícula al anticuerpo. El protocolo de acoplamiento consiste en colocar las nanopartículas fluidMAG-ARA en un búfer (MES) a una concentración de 0.1 M y un pH de 5, posteriormente se adicionan 250 μL de carbodimida y se incuba durante 10 min, de esta forma se activan los grupos funcionales de la matriz de polisacárido. A continuación se realizan dos lavados con MES empleando un separador magnético y se adiciona el anticuerpo para incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente se procede a lavar las nanopartículas unidas a su ligando pero ahora empleando un búfer salino de fosfatos. La figura 4 muestra la representación esquemática del principio de enlace covalente vía grupos carboxilos de una nanopartícula magnética del tipo fluidMAG-ARA y su ligando dado por el anti-CD10, tal acoplamiento fue practicado en este estudio.¹⁷

Microscopia

Con el objetivo de evidenciar físicamente el complejo bioconjugado nanopartícula-anticuerpo unido a la membrana de células cancerígenas, se utilizó microscopia confocal y microscopia electrónica de barrido; para el efecto se empleó el microscopio confocal marca Carl-Zeiss, modelo LSM 5 Pascal que se ubica en el Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, así como el microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6490LV que se ubica en el área de metalografía y microscopia electrónica del Centro de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico de la Industria Militar (CIADTIM). Este último microscopio nos permitió a su vez reconocer físicamente las nanopartículas magnéticas y comprobar la presencia de Fe en las mismas, para el efecto se utilizó el espectrómetro de energía dispersiva marca Oxford Instrument INCAX-SIGHT, modelo 7573, acoplado al microscopio electrónico mencionado.

Procedimiento ablativo

Muestras de leucocitos *in vitro* obtenidos mediante aspirado de médula ósea fueron marcados con nanopartículas magnéticas previamente acopladas al anticuerpo CD-10 como se describe en la sección “acoplamiento nanopartículas-anticuerpo”. Muestras adicionales de leucocitos fueron mantenidas sin acoplamiento de nanopartículas magnéticas. Ambos tipos de muestras fueron expuestas a la influencia de RF a través de la cámara descrita en la subsección “instrumentación biomédica”. Los tiempos de exposición fueron tres ciclos de 100 seg segmentados en 10 seg de exposición por 90 seg de relajación ($3 \times 10/90$). Una vez realizada la ablación con RF se realizaron pruebas de viabilidad celular mediante la exclusión de tinción con azul tripano, dicha prueba tiñe las células que han perdido la integridad de su membrana.

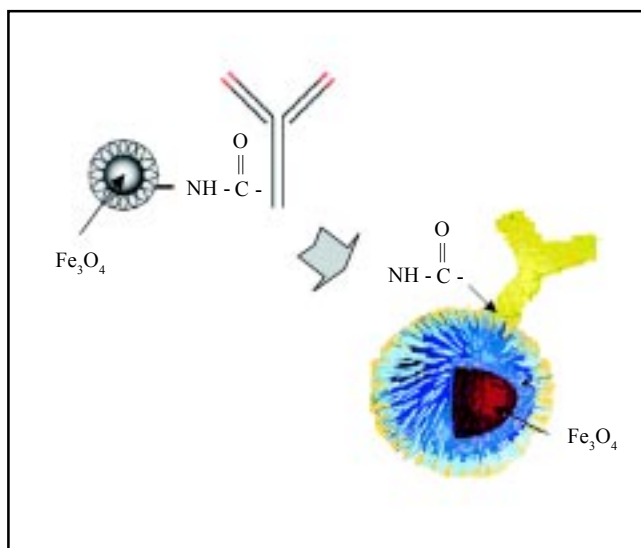


Figura 4. Representación esquemática del principio de enlace covalente vía grupos carboxilos de una nanopartícula magnética del tipo fluidMAG-ARA y su ligando dado por un anticuerpo monoclonal (anti CD-10).¹⁷

Resultados

La *figura 5* muestra los resultados de la simulación por computadora que determina la distribución de líneas de flujo magnético en la muestra tejido-partículas ferromagnéticas. Se observa una mayor concentración de energía (líneas de flujo magnético) en la región tumoral de la muestra que presenta concentraciones de partículas ferromagnéticas. Análogamente, la *figura 5* muestra el gradiente de temperatura en la muestra tejido-partículas ferromagnéticas. Se observa una mayor concentración de energía (temperatura) en la región tumoral de la muestra que presenta concentraciones de partículas ferromagnéticas. En las figuras sólo se muestra la mitad geométrica del modelo como una técnica

de optimización de recursos computacionales. Resultados parciales del presente estudio de simulación biofísica por computadora fue presentado por nuestro grupo en el IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, Isla Margarita, Venezuela, septiembre 2007.¹⁸

Como resultado de la técnica *in vitro* de células renales cancerígenas, se logró la obtención de células renales vivas y con capacidad de proliferación, logrando obtener células adheridas a los cuatro o cinco días después de la siembra y una confluencia de 20 y 40% para células sanas y tumorales, respectivamente. La confluencia fue de 30 y 40% para los 20 y 25 días, respectivamente. La *figura 6* muestra un cultivo primario de células tumorales y un cultivo primario de células normales. Los resultados de tamaño y granu-

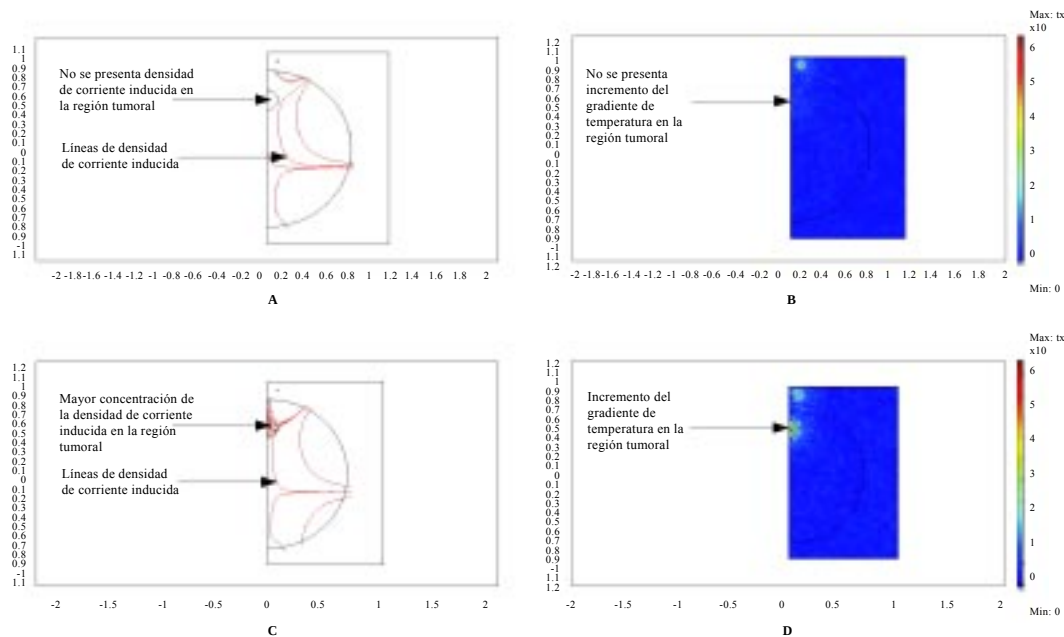


Figura 5. Simulación de la distribución de la densidad de corriente inducida en tejido renal sano y tumoral: **A)** Sin la influencia de nanopartículas magnéticas. **B)** Con la influencia de nanopartículas magnéticas. Simulación del gradiente de temperatura en tejido renal sano y tumoral: **C)** Sin la influencia de nanopartículas magnéticas. **D)** Con la influencia de nanopartículas magnéticas. Sólo se muestra la mitad geométrica del modelo como una técnica de optimización de recursos computacionales.

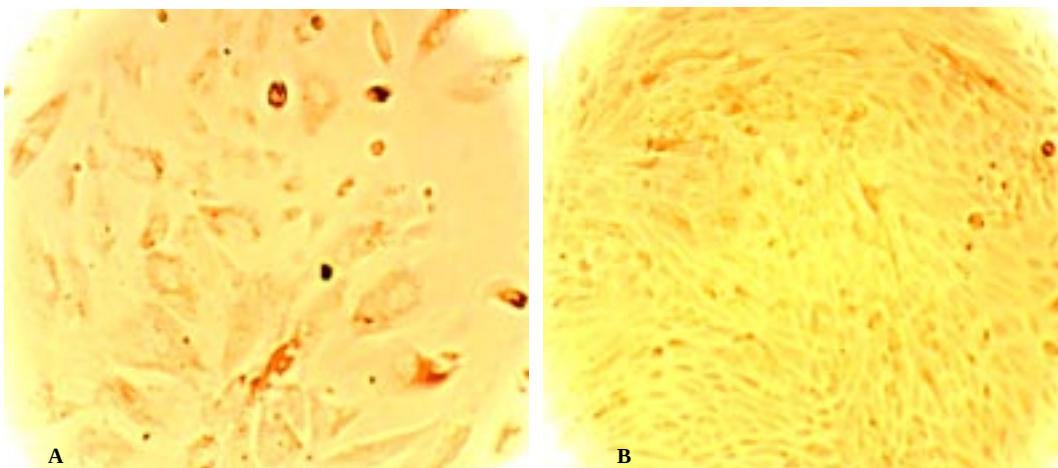


Figura 6. Cultivo primario de células tumorales **(A)** y células normales **(B)**, ambas muestras disgregadas de tejido renal tumoral y sano extraído por nefrectomía radical en el Hospital Central Militar. Imágenes obtenidas con microscopio invertido marca Reichert, modelo BioStart a 40X aumentos.

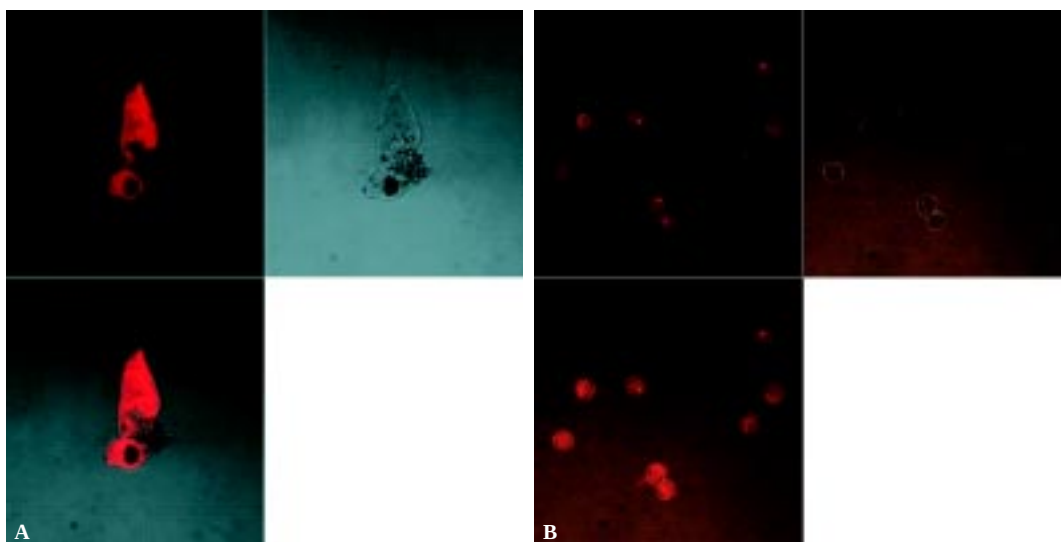


Figura 7. Aglomeración de nanopartículas que presentan fluorescencia acopladas a células cancerígenas. **A)** Célula renal cancerígena. **B)** Blastos obtenidos mediante aspirado de médula ósea (imágenes adquiridas a X1,000 aumentos con el microscopio confocal de la Escuela Médico Militar).

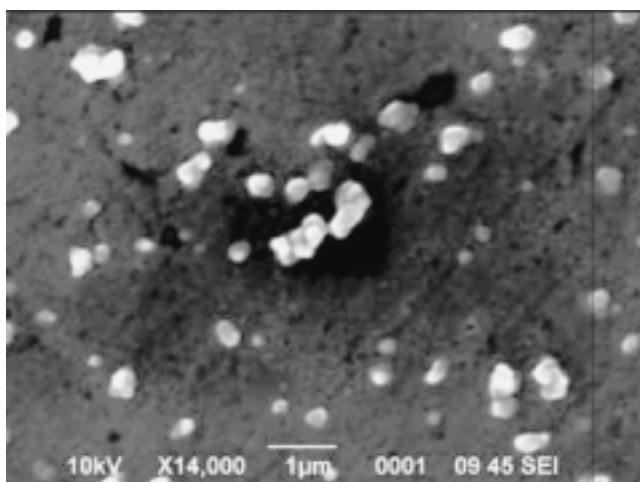


Figura 8. Fotografía de las nanopartículas magnéticas empleadas. Las nanopartículas son del tipo fluidMAG-ARA y tienen un diámetro aproximado de 300 nm. Imagen adquirida con el microscopio electrónico de barrido del CIADTIM.

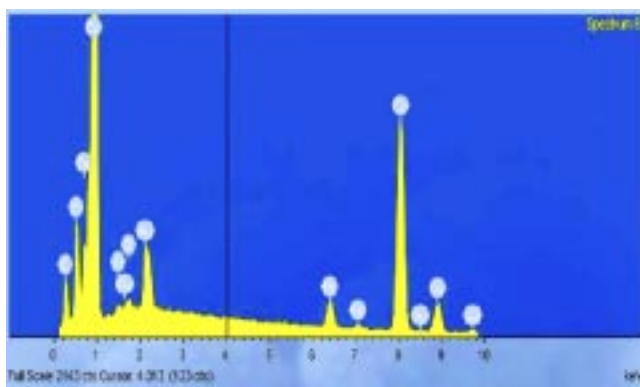


Figura 9. Espectro de microscopia electrónica correspondiente a las nanopartículas fluidMAG-ARA. La presencia de Fe es evidente y significativa. Espectro adquirido con el espectrómetro de energía dispersiva acoplado al microscopio electrónico de barrido del CIADTIM.

laridad así como los de conteos celulares obtenidos a través de citometría de flujo (gráficas Dot Plot) indican que la proporción de células normales y tumorales cultivadas son consistentes a las confluencias observadas microscópicamente. Células renales normales marcadas con el anticuerpo monoclonal CD-10 FITC mostró una intensidad de fluorescencia menor de 0.6%, mientras que las células renales tumorales tuvieron un porcentaje de 4.7%.

La *figura 7* muestra la fotografía de una célula renal cancerígena marcada con nanopartículas magnéticas. La *figura 6* muestra la fotografía de un leucocito obtenido mediante aspirado de médula ósea marcado con nanopartículas magnéticas. En ambos casos las nanopartículas fueron previamente acopladas al anticuerpo CD-10. Las imágenes se obtuvieron con microscopia confocal y un aumento X1000. La aglomeración de fluorescencia evidencia la pre-

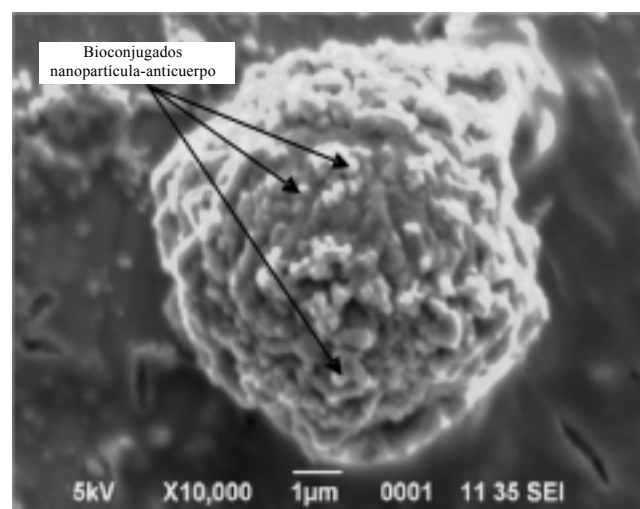


Figura 10. Fotografía que muestra los bioconjugados nanopartícula-anticuerpo embebidos en la membrana de una célula cancerígena. Imagen adquirida con el microscopio electrónico de barrido del CIADTIM.

Cuadro 1. Resultados de viabilidad de células leucémicas después de la exposición a RF con y sin acoplamiento de nanopartículas magnéticas.

	Viabilidad (%)			Temperatura (°C)		
	Antes de RF	Después de RF	Diferencia porcentual	Antes de RF	Después de RF	Diferencia porcentual
Células sin marcar	37	29	21.6	23	41	78.2
Células marcadas	38	28	26.3	23	46	100

sencia de complejos bioconjugados anticuerpo-nanopartícula magnética adheridos a la membrana de las células cancerígenas.

La *figura 8* muestra una fotografía que permite identificar las nanopartículas ferromagnéticas utilizadas en este estudio. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido del CIADTIM. Las nanopartículas fueron colocadas en una base de cobre y recubiertas con una fina capa de oro. Para su análisis se utilizó un aumento de X14,000 a 10KV. El diámetro de las nanopartículas observadas es del orden de 300 nm. Un análisis espectroscópico de una porción del campo mostrado en la *figura 8* reveló un contenido importante de Fe. La *figura 9* muestra un espectro de energía dispersiva correspondiente a las nanopartículas empleadas; se observa que la presencia de Fe es evidente y significativa.

La observación por microscopia electrónica nos permitió identificar la presencia de nanopartículas de Fe embebidas en la membrana de células cancerígenas, las cuales fueron sometidas al protocolo de acoplamiento previamente descrito. Para el efecto se empleó el microscopio electrónico de barrido del CIADTIM; se utilizó un aumento de X10,000 a 5KV. La *figura 10* muestra una fotografía de las nanopartículas ferromagnéticas de un diámetro aproximado de 300 nm embebidas en la periferia de la membrana de un leucocito. La imagen representa la viabilidad experimental de la unión del bioconjugado nanopartícula-anticuerpo al antígeno específico en la membrana celular.

Posterior al proceso de ablación por RF, los estudios de tinción con azul tripano permitieron identificar una diferencia en la viabilidad celular de aproximadamente 5% menor en las células marcadas con nanopartículas magnéticas con respecto a las que permanecieron sin marcar. El incremento en temperatura de las células marcadas fue aproximadamente 22% mayor con respecto a las células sin marcar. El *cuadro 1* muestra los resultados de viabilidad de células leucémicas después de la exposición a RF.

Discusión

La simulación biofísica por computadora de la exposición de tejido renal sano y tumoral a RF produjo una mayor inducción de corrientes en la región tumoral. Dicho comportamiento se explica por la mayor conductividad eléctrica que presenta el Fe con respecto al material biológico. La intensidad del campo eléctrico generado por las corrientes inducidas en el tejido se disipan en forma de

calor a través de las propiedades termoconductoras tisulares; en este sentido, el gradiente de temperatura se incrementa en la región tumoral como una función de la concentración de Fe, lo cual a su vez se puede interpretar como un efecto ablativo focalizado.

Los estudios realizados con microscopia confocal y microscopia electrónica de barridos en células renales cancerígenas y en blastos obtenido mediante aspirado de médula ósea, nos permiten inferir la presencia de complejos bioconjugados anticuerpo-nanopartícula magnética adheridos a la membrana de las células en estudio. Sin embargo, dicha evaluación basada en imágenes representa una interpretación cualitativa del efecto de acoplamiento, por lo que el presente estudio aún requiere completarse con una técnica de evaluación cuantitativa que relacione la cantidad de nanopartículas empleadas en el protocolo de acoplamiento en una población celular determinada y en función de tal referencia estimar la proporción relativa de nanopartículas magnéticas adheridas a la membrana celular.

Los análisis con azul tripano realizados después de la exposición de cultivos celulares a RF arrojan un decremento en la viabilidad de las células marcadas con nanopartículas magnéticas con respecto a las que permanecieron sin marcar. Tal decremento se relaciona a una consistente diferencia en la temperatura alcanzada en ambas muestras de cultivos celulares, lo anterior indica que la viabilidad celular está asociada a las propiedades termoconductoras de células marcadas con las nanopartículas magnéticas. Tales propiedades son a su vez son una función de la conductividad eléctrica que presenta el Fe. Así, la intensidad del campo eléctrico generado por las corrientes inducidas promueve un incremento en el gradiente de temperatura principalmente en la vecindad de las nanopartículas acopladas, lo cual a su vez se refleja como un proceso ablativo selectivo en la vecindad de las membranas de células marcadas con tales nanopartículas.

Conclusión

La simulación por computadora de la exposición a RF de tejido renal tumoral con concentraciones de nanopartículas ferromagnéticas mostró desde el punto de vista teórico la pertinencia de la técnica propuesta como un método alternativo en el tratamiento del cáncer. Los resultados experimentales indican que el protocolo de acoplamiento empleado es adecuado y específico para efectos de marcar selectivamente células cancerígenas. La exposición a RF de células cance-

rígenas *in vitro* con y sin acoplamiento de nanopartículas magnéticas, así como la posterior evaluación de viabilidad celular sostienen que la técnica propuesta tiene el potencial de llegar a ser una método no invasivo para la ablación focalizada de cáncer a través de RF.

Referencias

1. Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información de en Salud. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx> (Consultado el 15 octubre de 2007).
2. Dirección General de Epidemiología, Instituto Nacional de Cancerología, Asociación Mexicana de Patólogos. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. Morbilidad y Mortalidad, Bienio 1993-1994, Tendencias 1985-1994. México, D.F.: Secretaría de Salud; 1996.
3. Janzen N, Zisman A, Pantuck AJ, Perry K, Schulam P, Belldegrin AS. Minimally invasive ablative approaches in the treatment of renal cell carcinoma. *Curr Urol Rep* 2002; 3:13-20.
4. Gervais DA, McGovern FJ, Arellano RS, McDougal WS, Mueller PR. Renal cell carcinoma: clinical experience and technical success with radio-frequency ablation of 42 tumors. *Radiology* 2003; 226: 417-24.
5. Pavlovich CP, Walther MM, Choyke PL, et al. Percutaneous radio frequency ablation of small renal tumors: initial results. *J Urol* 2002; 167: 10-5.
6. Su LM, Jarrett TW, Chan DY, Kavoussi LR, Solomon SB. Percutaneous computed tomography-guided radiofrequency ablation of renal masses in high surgical risk patients: preliminary results. *Urology* 2003; 61(Suppl. 1): 26-33.
7. Farrell MA, Charboneau WJ, DiMarco DS, et al. Imaging-guided radiofrequency ablation of solid renal tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 1509-13.
8. Mayo-Smith WW, Dupuy DE, Parikh PM, Pezzullo JA, Cronan JJ. Imaging-guided percutaneous radiofrequency ablation of solid renal masses: techniques and outcomes of 38 treatment sessions in 32 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 1503-8.
9. Roy-Choudhury SH, Cast JE, Cooksey G, Puri S, Breen DJ. Early experience with percutaneous radiofrequency ablation of small solid renal masses. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 1055-61.
10. Ogan K, Jacomides L, Dolmatch BL, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of renal tumors: technique, limitations, and morbidity. *Urology* 2002; 60: 954-8.
11. Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 323-31.
12. Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, Nagy AG, Buczkowski AK. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo: effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg* 1998; 227: 559-65.
13. Lu DS, Raman CC, Vodopich DJ, et al. Effect of vessel size on creation of hepatic radiofrequency lesions in pigs: assessment of the "heat sink" effect. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 187: 47-51.
14. Horkan C, Ahmed M, Liu Z, et al. Radiofrequency ablation: effect of pharmacologic modulation of hepatic and renal blood flow on coagulation diameter in a VX2 tumor model. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 269-74.
15. Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, et al. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. 2006; 78(1): 7-14.
16. Hilger I, Rapp A, Greulich K-O, et al. Assessment of DNA Damage in Target Tumor Cells after Thermoablation in Mice 1. *Radiology* 2005; 237: 500-6.
17. DeNardo SJ, DeNardo G, Miers LA. Development of Tumor Targeting Bioprobes (111 In-Chimeric L6 Monoclonal Antibody Nanoparticles) for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(19 7087s Suppl); 2005.
18. González CA, Silva JG, Lucio FP, Villanueva C. "Modelo Biofísico Bidimensional que Simula el Efecto Ablativo Focalizado de Tejido Renal Cancerígeno a través de Radiofrecuencia y Nanopartículas Ferromagnéticas", Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, Isla Margarita, Venezuela, 2007 (En prensa).

