

Uso de nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes

Jennifer Soler Beatty

Resumen— La diabetes mellitus es un desorden metabólico prevalente asociado a la obesidad y a la falta de ejercicio físico, que conlleva el aumento de la glucosa en plasma. La hiperglucemia puede desencadenar complicaciones tales como la ceguera, enfermedades del hígado o corazón, neurodegeneración y mayor susceptibilidad a infecciones. Por esta razón, el control de la glucemia a largo plazo es clave para determinar el pronóstico del paciente con diabetes. La nanotecnología permite, mediante un amplio abanico de herramientas, mejorar la calidad de vida de los pacientes con diabetes. Entre ellas destacan: El uso de NPs como agentes de contraste para la visualización de los islotes pancreáticos; sensores de glucosa precisos y sensibles, que permiten la detección a tiempo real de niveles de glucosa en plasma; sistemas de detección precoz de la diabetes y terapias no invasivas de liberación controlada de insulina. Asimismo, la nanotecnología nos permite el desarrollo de vacunas más eficientes y tratamientos alternativos basados en terapia génica. En este artículo se revisarán algunas de las estrategias a nanoescala utilizadas para el diagnóstico, tratamiento y monitorización de dicha enfermedad.

Palabras Claves— Diabetes mellitus, nanopartículas de plata, GLP-1, nanohilos, exenatida, sensores de glucosa, insulina oral

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus se define como un grupo de desórdenes metabólicos, caracterizados por niveles de glucosa en sangre elevados (hiperglucemia). Muchas de las complicaciones asociadas a la diabetes son consecuencia de daños producidos en las células β pancreáticas, debido a un incremento del estrés oxidativo [1]. La diabetes tipo 2 (T2DM) es la enfermedad metabólica más prevalente, y constituye el 90% de todos los casos. La T2DM se caracteriza por resistencia a la insulina, alteración en la homeostasis de la glucosa y disfunción de las células β . El otro 10 % de los casos corresponde a la diabetes tipo 1 (T1DM), que resulta de una deficiencia en la producción de insulina como consecuencia de una respuesta autoinmune. Esta falta de tolerancia inmunológica conlleva a la destrucción de las células β mediada por linfocitos T (hipoinsulinemia). Los tratamientos antidiabéticos actuales incluyen sulfonilureas, biguanida, meglitinida, inhibidores α glucosidasas y tiazolidinedionas. Sin embargo, el uso de dichos fármacos está limitado por sus efectos secundarios como intolerancia gastrointestinal, aumento del peso corporal y formación de edemas. Por consiguiente, es necesaria la generación de nuevas terapias que minimicen los efectos adversos, así como, de forma conjunta, nuevos sistemas de diagnóstico temprano y monitorización de la enfermedad [2].

2. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS

2.1. Nanopartículas de TiO_2 funcionalizadas en nanohilos de In_2O_3

La funcionalización de nanohilos de In_2O_3 con nanopartí-

culas de TiO_2 ha permitido una elevada selectividad y sensibilidad para la detección del vapor de acetona. La capacidad de detectar la acetona en el rango de la ppm es importante para el diagnóstico de la diabetes. Esto es debido a que en el exhalado de los pacientes con diabetes la concentración de vapor de acetona oscila entre 1.8-10 ppm, mientras que el individuo normal está por debajo de las 0.8 ppm. Se evaluó que la sensibilidad del sensor aumentaba de forma lineal con respecto a la concentración de acetona, atendiendo al modelo de depleción superficial. Este modelo se basa, en que en presencia de aire sobre la superficie de los nanohilos se adsorben moléculas de O_2 , que por transferencia de electrones (e^-) del In_2O_3 , inducen la formación de iones O^- , lo que conlleva a un aumento en la resistencia del nanohilo a la conducción de la corriente. Sin embargo, en presencia de vapores de acetona, las especies de acetona adsorbidas en el nanohilo, por una serie de reacciones secuenciales, extraen $12 e^-$ de los iones O^- . Estos e^- son revertidos a los nanohilos, lo que conlleva un descenso en la resistencia del semiconductor, y, por tanto, se incrementa la conductividad del nanohilo. La funcionalización del nanohilo con nanopartículas de TiO_2 genera 'n-n junctions' donde los e^- permanecen atrapados, lo que provoca que en presencia de oxígeno el canal de conducción se reduzca en mayor proporción en comparación a los nanohilos no funcionalizados. Esto conlleva que la sensibilidad de dichos sensores funcionalizados sea mayor puesto que la anchura de la capa de depleción en los nanohilos cambia de forma más drástica [3].

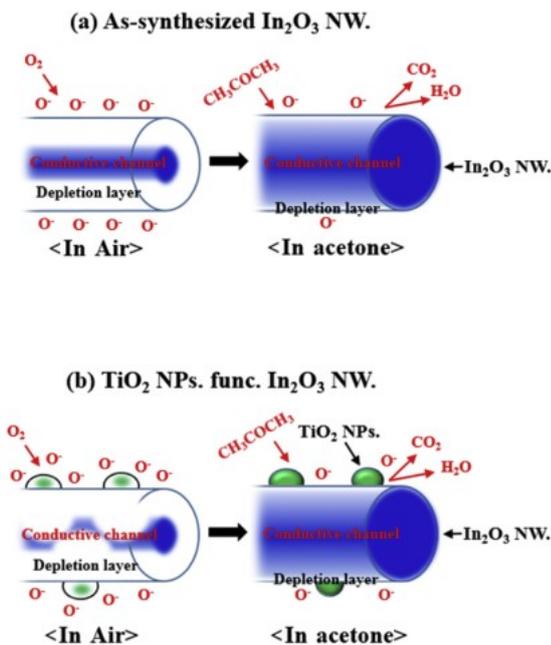


Fig. 1. Esquema de la estructura eléctrica de (a) nanohilos de In_2O_3 y (b) funcionalizados con nanopartículas de TiO_2 expuestos a aire o vapores de acetona

2.2. Detección electroquímica mediante nanopartículas de plata

Mutaciones en el DNA mitocondrial (DNAMt) están asociadas a la aparición de la T2DM, siendo la mutación más común el polimorfismo A3243G en el gen que codifica el tRNA para la leucina. La detección de dicho polimorfismo permitiría el diagnóstico temprano y el tratamiento de los pacientes con T2DM. El sensor se fundamenta en el crecimiento de nanopartículas de plata (AgNP) mediante un soporte de DNA sobre una superficie de nanotubos de carbono (SWCNTs: single walled carbon nanotubes) absorbidos en un electrodo GCE (glass carbon electrode). Como mecanismo de amplificación de la señal se incorporará una *RNAasa* HII. Además, el sistema cuenta con sondas de captura (SP) conjugadas a microbolas de sílica (SiMBs). La SP presenta un ribonucleótido en la región intermedia que es reconocido por la RNAasa HII e hibrida de forma específica con la mutación que se pretende analizar. La RNAasa HII hidroliza el enlace fosfodiéster 5' del ribonucleótido en la unión DNA-RNA liberando ssDNA que corresponden a la sonda señal (SP). Estos SPs actúan como molde para el crecimiento *in situ* de AgNP. Finalmente, se evaluó que la señal electroquímica, por la transformación en estado sólido de AgNPs a AgCl en la superficie del electrodo, tiene una relación lineal con la cantidad de DNAMt diana. Entre las múltiples ventajas de dicho sistema de detección se puede mencionar que no necesita el marcaje previo de la muestra y un límite de detección del orden de pM [4].

2.3. Nanopartículas supermagnéticas como agentes de contraste en MRI y sensores de glucosa

Las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs)

nos permiten la cuantificación *in vivo*, de forma no invasiva, de la masa total de células β en los islotes de Langerhans. Además, son biocompatibles y se pueden degradar en hierro y oxígeno. Actualmente, han sido utilizadas para monitorizar infiltración linfocitaria en el páncreas, para una detección temprana de la diabetes [5]. Por otro lado, se han empleado nanocubos de óxido de hierro ferromagnético para aumentar la resolución de la MRI. Estas NPs permiten la visualización de células individuales en los islotes pancreáticos [6].

Entre los sensores de glucosa, se pueden mencionar las NPs de paladio, oro, platino o nanotubos de carbono en combinación con la glucosa oxidasa. La glucosa, al unirse a la enzima, se oxida en pasos sucesivos hasta dar lugar a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Durante la oxidación de la glucosa se genera una corriente eléctrica, proporcional a la concentración de la glucosa. Entre los sensores no enzimáticos se puede destacar las moléculas de unión a glucosa como la lecitina ConA (concanavalina A) y PBA (fenilborónico). Cuando la glucosa se une al sensor provoca un desplazamiento de la densidad de electrones que se puede medir con una señal de salida de fluorescencia o de voltaje. Finalmente se están intentando diseñar sensores basados en la emisión de fluorescencia mediante el uso de quantum dots [7].

3. TRATAMIENTO DE LA DIABETES CON NANOPARTÍCULAS

3.1. Sistemas de liberación de insulina dependientes de sensores de glucosa

Los sensores mencionados anteriormente pueden utilizarse acoplados a sistemas de liberación de insulina en respuesta a glucosa plasmática. Uno de los mecanismos propuestos es el uso de NPs constituidas por polímeros sensibles al pH, como el quitosano, combinados con la enzima glucosa oxidasa. Esta enzima, al convertir la glucosa en ácido glucónico, reduce el pH del microambiente, produciendo la liberación de la insulina encapsulada, por alteración en la estructura de la NP [8].

Otro sistema en fase I, es el 'Smart Insulin' L-490 que utiliza la capacidad de la lecitina ConA para unirse a la glucosa. Cuando las concentraciones de glucosa en plasma son bajas, el elemento de unión ConA interacciona con la insulina evitando que ejerza su acción. Mientras que, a niveles altos de glucosa, esta se une a los sitios ConA de la nanopartícula polimérica produciendo la liberación de la insulina [7].

Por último, mencionar la encapsulación de insulina en NPs de PLGA. Estas NPs producen una liberación basal de insulina en condiciones normales, pero está se ve incrementada por exposición a ultrasonidos. Esto es debido a que la exposición a ultrasonidos altera la difusión de la insulina por la matriz, como consecuencia del calentamiento y la cavitación. Este sistema permitiría mediante una sola inyección almacenar grandes cantidades de insulina de forma subcutánea e ir liberándola de forma sostenida

mediante un sistema de ultrasonido localizado [9].

3.2. Nanopartículas inorgánicas de óxido de zinc

Se ha utilizado la combinación de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) con fármacos antidiabéticos estandarizados (vildagliptina) para restaurar la función y estructura de células β . Se evaluó que la administración de las NPs en modelos de rata con diabetes tipo 2 inducida, mejoraba las alteraciones asociadas como la tolerancia a la glucosa, niveles de fructosamina, actividad SOD pancreática, biomarcadores de diabetes (miR103, miR-143), histología de los islotes, hemoglobina glicosilada y alteración de lípidos en plasma. Por lo tanto, las ZnONPs junto a la vildagliptina presentan un efecto sinérgico para el tratamiento de la diabetes tipo 2 [1].

3.3. Nanocomplejos de quitosano basados en terapia génica

La hormona incretina GLP-1 (glucagón-like peptide) está relacionada con un incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Además, estimula el crecimiento de las células β e inhibe su apoptosis. Sin embargo, presenta una baja biodisponibilidad como consecuencia a su degradación por la endoproteasa DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV). Para aumentar la biodisponibilidad de GLP-1 se combinó con el polímero catiónico quitosano (CH), que es capaz de formar nanocomplejos con ácidos nucleicos. Por lo tanto, se utilizaron dichos nanocomplejos para la liberación *in vitro* de GLP-1, análogos de GLP-1 resistentes a DPP-IV y siRNA dirigidos a la DPP-IV. Por último, mencionar que dicho sistema logró un silenciamiento eficiente similar al producto comercial DharmaFect™, pero con menor efecto citotóxico. Por lo tanto, el uso de nanocomplejos de CH y ácidos nucleicos podría utilizarse como terapia combinada para el tratamiento de la T2DM [2].

3.4. Liberación controlada de exenatida

La exenatida es un antagonista de GLP-1 que se utiliza como terapia combinada para la T2DM. Debido a su pequeño tamaño se elimina rápidamente por filtración glomerular. Para aumentar su vida media en plasma y evitar la degradación enzimática, se apuesta por sistemas de encapsulación. Un ejemplo, es la generación de estructuras multicapa de nanopartículas de L- α fosfatidilcolina incorporadas en una bicapa lipídica, mediante la adición de ácido plurónico. Durante la liofilización, la región hidrofóbica del ácido plurónico permite que se ancle de forma física a la superficie del liposoma de lecitina, permitiendo el diseño de una multicapa de nanopartículas. Este sistema de encapsulación no altera la estructura del compuesto activo, y se produce una eficiencia de encapsulación del 85-87%. Esta multicapa de nanopartículas permite una liberación sostenida de la exenatida, que correlaciona con la actividad antidiabética más prolongada *in vivo*. Por consiguiente, los sistemas de multicapa de NPs pueden utilizarse como vehículos de liberación sostenida de fármacos de origen proteico [10].

Este sistema se implementó mediante la formación de un hidrogel termorreversible por combinación con plurónico

F-127. *In vivo*, mediante inyecciones subcutáneas en ratones db/db y monitorización de glucosa en plasma, se determinó que el hidrogel mejora los efectos antidiabéticos de la exenatida, y que el retorno de los niveles de glucosa a sus valores originales, se produce de forma más gradual [11].

3.5. Administración oral de insulina

El principal inconveniente de la administración oral de la insulina es su baja biodisponibilidad, debido a procesos de degradación por pH ácido y proteasas, y su baja permeabilidad a nivel del epitelio intestinal. Para mejorar la entrada de insulina a las células, se han desarrollado nanopartículas dirigidas a enterocitos y células M de la mucosa, mediante la funcionalización con lecitina. Además, se ha diseñado un sistema basado en nanopartículas de polietilimina para la liberación de la insulina a nivel del colón.

La liberación controlada de la insulina a nivel del colón presenta varias ventajas, como unos efectos hipoglucémicos a largo plazo. Además, permite la liberación fisiológica de la insulina a la vena portal, lo que evita fluctuaciones de los niveles plasmáticos de glucosa y efectos secundarios de la administración subcutánea como: hiperinsulinemia sistémica, ganancia de peso, aterogénesis, lipodistrofia local y aumento de la lipogénesis [12].

Otro ejemplo es el uso de NPs de alginato y sulfato de dextrano recubiertas con quitosano y albúmina (^{99m}Tc -BSA) y cargado con insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y 2. En el caso de la diabetes tipo 1 consigue aumentar los efectos antihyperglucémicos durante 12h y un incremento de la biodisponibilidad de 5.04 %, en comparación a la administración subcutánea. Además, dichas NPs presentan las ventajas de que no son absorbidas a nivel sistémico y permiten mayor residencia en el epitelio intestinal. Esto es debido a la capacidad del quitosano de unirse a los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa intestinal. Por lo tanto, dichas NPs son capaces de mantener la estabilidad durante su paso por el aparato gastrointestinal y evitan la liberación prematura de la insulina. También producen un efecto antihyperglucémico más sostenido y a largo plazo, y aumentan la entrada de la insulina por las células del intestino [13].

3.6. Nanopartículas de poli(láctida-co-glicólico) acoplados con Ag (Ag-PLG) para el tratamiento de T1D

Actualmente se apuesta por terapias que vayan dirigidas de forma específica a las células autoinmunes para prevenir y revertir la T1DM, sin la administración de inmunosupresores. Una estrategia, es la inducción de tolerancia de linfocitos T autorreactivos utilizando nanopartículas sintéticas que están entrecruzadas con antígenos dianas importantes en la patogenicidad, mediante etilencarboimidida (ECDI). El efecto terapéutico de dichas nanopartículas requiere la expresión de MARCO, un receptor expresado en células fagocitarias. Este receptor permite la entrada y presentación de los antígenos diabéticos por parte

de células presentadoras de antígenos (APC) tolerogénicas. Las APC tolerogénicas inducen anergia y apoptosis de linfocitos T autorreactivos, mediante el aumento de la expresión de PD-L1, que modula la señal co-estimuladora. Además, inducen anergia en linfocitos T naïve mediante la presentación del antígeno junto al MHC en ausencia de una señal co-estimuladora (CD80/CD86). Por último, la expresión de PD-L1 y la producción de IL-10 por parte de las APC tolerogénicas induce la expresión de linfocitos Treg, que inhiben la diferenciación de linfocitos T naïve y la función de los linfocitos T patogénicos. En conclusión, las nanopartículas manufacturadas con autoantígenos, antígenos encapsulados o sustancias que promueven la tolerancia en nanoesferas, son un sistema óptimo para revertir el carácter autoinmune de la T1DM [14].

3.7. Otras terapias alternativas

Una de las terapias propuestas, es el uso de nanocapas para proteger las células trasplantadas frente al sistema inmune, a la vez que permiten una difusión adecuada de glucosa, oxígeno, insulina y de otros nutrientes necesarios. Para lograr dicho objetivo, se han desarrollado sistemas mono o multi-capa de recubrimiento que protejan los islotes de Langerhans, sin inhibir su función. Un ejemplo, es el empleo de nanopartículas poliméricas PEG, mediante el método de autoensamblaje capa por capa gracias a la afinidad de los grupos PPB (biotina) y SA (estreptavidina) [15].

Otra estrategia es la utilización de SPIONs para inducir la producción de insulina en células β , mediante hipertermia por aplicación externa de una corriente magnética alterna [16].

Por último, mencionar el uso de vacunas como estrategia a largo plazo para prevenir la destrucción autoinmune de las células β en T1DM. El uso de NPs en vacunas permite la eliminación de la necesidad de utilizar adyuvantes y puede direccionar antígenos a regiones específicas del organismo. Además, constituyen plataformas físicas que confieren la propiedad de combinar antígenos. Un ejemplo, es el uso de NPs magnéticas recubierta con péptidos apropiados unidos al MHC (p-MHC-NPs) [17].

4. CONCLUSIONES

La investigación en nanotecnología y nanomedicina ha permitido el desarrollo de terapias y herramientas de diagnóstico temprano más eficaces. Las NPs orgánicas, inorgánicas o híbridas permiten transportar de forma segura y eficiente la insulina o análogos. Además, algunas de las NPs presentan actividad biológica que ayuda de forma combinada en el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus, y sus complicaciones asociadas. Esto se logra mediante actividad antioxidante, anti-apoptótica o la capacidad de mimetizar la acción de la insulina. También, las NPs presentan unas propiedades fisicoquímicas que les permiten ser utilizadas como herramientas de diagnóstico precoz y monitorización de la enfermedad de forma no invasiva.

Atendiendo a la información aportada, se prevé una oportunidad prometedora en el desarrollo de sistemas a nanoescala que combinen la liberación controlada de insulina acoplada a un sensor de glucosa. A pesar de ser un campo en auge, se requiere el desarrollo de nanosensores de mayor sensibilidad y especificidad, y reducir el tiempo entre la detección y la liberación terapéutica. No obstante, por los resultados que se están obteniendo se espera que la nanotecnología juegue un papel importante en la mejora del manejo de la diabetes en la próxima década.

Referencias

- [1] El-Gharbawy R, Emara A and Abu-Risha S, "Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes", *Biomedicina & Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 810-820, Jun/Sep 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.068
- [2] Jean M, Alameh M, De Jesus D *et al.* "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, pp. 130-149, Jun/Oct 2011 doi: 10.1016/j.ejps.2011.10.029
- [3] Park S, "Acetone gas detection using TiO₂ nanoparticles functionalized In₂O₃ nanowires for diagnosis of diabetes", *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 696, pp. 655-662, Mar 2017 doi: 10.1016/j.jallcom.2016.11.298
- [4] Tao J, Zhao P, Zheng J *et al.* "Electrochemical detection of type 2 diabetes mellitus-related SNP via DNA-mediated growth of silver nanoparticles on single-walled carbon nanotubes", *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 86, pp. 15704-15707 Jan 2015 doi: 10.1039/x0xx00000x
- [5] Veisah O, Gunn J and Zhang M, "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 3, pp. 284-304 Mar 2010 doi: 10.1016/j.addr.2009.11.002
- [6] Lee N, Kim H, Choi S *et al.* "Magnetosome-like ferromagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 7, pp. 2662-2667 Jan/Nov 2011 doi: 10.1073/pnas.1016409108
- [7] Veiseh O, Tang B, Whitehead K *et al.* "Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities", *Nature Reviews*
- [8] Gu Z, Dang T, Ma M *et al.* "Glucose-Responsive Microgels Integrated with Enzyme Nanocapsules for Closed-Loop Insulin Delivery", *ACS Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 6758-6766 Jul 2013 doi: 10.1021/nn401617u
- [9] Di J, Price J, Gu X *et al.* "Ultrasound-Triggered Regulation of Blood Glucose Levels Using Injectable Nano-Network", *Advanced Healthcare Materials*, vol. 3, no. 6, pp. 811-816 Nov 2013 doi: 10.1002/adhm.201300490
- [10] Kim J, Lee H, Oh K *et al.* "Multilayer nanoparticles for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus", *Biomaterials*, vol. 34, no. 33, pp. 8444-8449 Jun/Jul 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.040
- [11] Oh K, Kim J, Yoon B *et al.* "Sol-gel transition of nanoparticles/polymer mixtures for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus", *European Journal of Pharmaceu-*

tics and Biopharmaceutics, vol. 88, no. 3, pp. 664-669, May/Au 2014 doi: 10.1016/j.ejpb.2014.08.004

- [12] Mazzucchelli S and Corsi F, "Diabetes management strategies: can nanoparticles be used to therapeutically deliver insulin?", *Therapeutic Delivery*, vol. 8, no. 2, pp. 49-51 Nov 2016 doi: 10.4155/tde-2016-0081
- [13] Lopes M, Aniceto D, Abrantes M *et al.* "In vivo biodistribution of antihyperglycemic biopolymer-based nanoparticles for the treatment of type 1 and type 2 diabetes", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 113, pp. 88-96 doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.037
- [14] Prasad S, Xu D and Miller S, "Tolerance Strategies Employing Antigen-Coupled Apoptotic Cells and Carboxylated PLG Nanoparticles for the Treatment of Type 1 Diabetes", *The Review of Diabetic Studies*, vol. 9, no. 4, pp. 319-327 Dec 2012 doi: 10.1900/RDS2012.9.319
- [15] Wilson J, Cui W and Chaikof E, "Layer-by-Layer Assembly of a Confromal Nanothin PEG Coating for Intraportal Islet Transplantation", *Nano Letters*, vol. 8, no. 7, pp. 1940-1948 Jul 2008 doi: 10.1021/nl080694q
- [16] Stanley S, Gagner J, Damanpour S *et al.* "Radio -Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice", *Science*, vol. 336, no. 6081, pp- 604-608, May 2012 doi: 10.1126/science.1216753
- [17] Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J *et al.* "Reversal of Autoimmunity by Booting Memory-like Autoregulatory T Cells", *Immunity*, vol. 32, no. 4, pp. 568-580 Apr 2010 doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.015



Jennifer Soler Beatty. Graduada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia. Actualmente cursando el máster de biotecnología sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide.