



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

REACCIÓN CATALÍTICA DE GLUCOSA OXIDASA COMO
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA AL CÁNCER

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA

Alumna: Daniela Cano Muñoz

Profesor Guía: T.M Luis Guzmán

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

INDICE DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	3
2.	INTRODUCCIÓN	5
3.	OBJETIVOS	8
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	8
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
4.1	EFFECTOS DE LA CATÁLISIS DE GOX SOBRE LA CÉLULA TUMORAL.....	9
4.1.1	TERAPIA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA DE CÉLULAS TUMORALES	13
4.1.2	TERAPIA DE OXIDACION.....	17
4.1.3	TERAPIA DE HIPOXIA	18
4.2	FARMACOCINÉTICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA	21
4.2.1	UTILIZACIÓN DE HIDROGELES COMO VEHÍCULO DE GOX EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	25
4.2.2	ROL DE LA NANOTECNOLOGÍA ACOPLADA A GOX.....	31
5.	CONCLUSIONES	42
6.	BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1.....	10
TABLA 1.....	11
FIGURA 2.....	12
FIGURA 3.....	15
FIGURA 4.....	20
FIGURA 5.....	22
TABLA 2.....	24
FIGURA 6.....	28
FIGURA 7.....	29
FIGURA 8.....	30
FIGURA 9.....	31
FIGURA 10.....	34
FIGURA 11.....	35
FIGURA 12.....	36
FIGURA 13.....	38
FIGURA 14.....	40
TABLA 3.....	40

1. RESUMEN

El cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades que tienen en común la proliferación rápida de células anormales. Las células cancerosas cambian sus vías metabólicas por su necesidad aumentada de nutrientes. Se ha investigado el uso de la enzima Glucosa Oxidasa en terapias alternativas contra el cáncer debido a la reacción que cataliza consumiendo glucosa y oxígeno, que son fundamentales para el desarrollo del tumor y generando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno que son productos que ayudan a desencadenar la apoptosis. El problema del uso de enzimas como terapias es su baja estabilidad, probable toxicidad además de su rápida eliminación. Para esto se han utilizado materiales inmovilizadores como hidrogeles y nanopartículas. Los hidrogeles son redes poliméricas reticuladas, hinchadas por el agua y entrecruzadas producidas por la reacción de uno o más monómeros mientras que las nanopartículas (NP) son una amplia clase de materiales que incluyen sustancias particuladas, que tienen una dimensión de menos de 100 nm. En los últimos años se han fabricado diferentes hidrogeles y nanopartículas acoplados ya sea únicamente a GOX o a la enzima y otras moléculas para desarrollar estrategias terapéuticas contra el cáncer ya sea basadas en la catálisis enzimática para la apoptosis de células tumorales, como inhibidor de efectos secundarios que pueden traer ciertas terapias ya existentes, o como inductor de la activación de ciertos fármacos que requieren un entorno particular.

2. INTRODUCCIÓN

Según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas (1); existen muchos tipos de cáncer, pues no es una sola enfermedad. El cáncer puede originarse en los pulmones, en el seno, en el colon o hasta en la sangre. Los diferentes tipos de cáncer tienen algunas similitudes, pero son diferentes en la manera en que crecen y se propagan. (2) La Organización Mundial de la Salud dicta que una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis». Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. (3) Para mantener una mayor proliferación celular, las células cancerosas cambian distintas vías metabólicas de las células normales y así obtienen los requerimientos energéticos necesarios; una de las vías transformadas más estudiadas es de la utilización de glucosa, ya que las células cancerosas necesitan cambiar su metabolismo a uno donde predomina la glucólisis y disminuye la función mitocondrial. Las células tumorales utilizan la glucosa para generar lactato aun en condiciones de normoxia celular. Un aspecto muy relevante es que estas células no solo utilizan la glucosa para la producción de energía y sustratos sino que también para la biosíntesis de macromoléculas, mediante la producción de intermediarios glicolíticos que actúan como precursores de nucleótidos, aminoácidos y lípidos por medio de la vía de las pentosas fosfato (PPP). (4) Por otro lado, el piruvato generado a través de la vía glicolítica va a aumentar aún más la concentración de ATP gracias al ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), ya que existe oxidación de acetil-CoA a CO₂ en respiración aeróbica acompañada de reducción de NAD⁺ y flavin adenin trinucleótido (FAD) durante el ciclo del CAT. Los productos intermediarios NADH y FADH₂ sirven como coenzimas de la cadena transportadora de electrones (CTE), catalizando finalmente la formación de ATP. (5) Una ruta adicional que proporciona alta demanda de NADPH en células en proliferación implica la síntesis de NADPH a partir del metabolismo de la glutamina. La glutamina es el aminoácido más abundante en el plasma humano y un importante contribuyente a la reposición de los productos intermedios del ciclo CAT. Dicha reposición mantiene el flujo

intermedio de TCA manteniendo precursores para muchos aminoácidos no esenciales para la síntesis de biomasa. Los ácidos grasos, como el acetil-CoA, junto con las moléculas de nitrógeno en los nucleótidos, aminoácidos y azúcares, también pueden derivarse de la glutamina, así como de la glucosa. (6) Estos cambios metabólicos descritos anteriormente aumentan la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) desencadenando un mayor estrés oxidativo en la propia célula cancerosa, lo cual favorece la iniciación y progresión del cáncer mediante la activación de vías de señalización que regulan la proliferación, diferenciación, supervivencia y alteración del metabolismo celular. (4)

La glucosa oxidasa (β -D-glucosa: oxígeno 1-oxidoreductasa; EC 1.1.3.4; GO) es una flavoenzima que cataliza la oxidación de la β -d-glucosa a la D-gluconolactona. El producto intermedio de la catálisis es un complejo reducido de enzima-FADH₂ que, en presencia de oxígeno, se oxida de nuevo a enzima-FAD con la liberación de peróxido de hidrógeno. La glucosa oxidasa se usa ampliamente en ensayos de diagnóstico para la determinación de concentración de glucosa en fluidos fisiológicos. La detección de productos de oxidación se realiza a través de una reacción enzimática acoplada que libera H₂O₂ lo que se hace reaccionar con peroxidasa y un sustrato cromogénico adecuado. El desarrollo del color del sustrato es proporcional a la cantidad de H₂O₂ liberado que a su vez se relaciona con la cantidad inicial de glucosa presente. (7)

Si se considera el metabolismo de las células cancerosas, principalmente su alta necesidad metabólica y por otro lado se toma en cuenta la acción que tiene la enzima glucosa oxidasa, que utiliza glucosa y genera peróxido de hidrógeno, se puede llegar a la elaboración de una alternativa o complemento en la terapia contra el cáncer, ya que, si se administra glucosa oxidasa intratumoral esta puede afectar al tumor por el efecto sinérgico de consumo de glucosa, bloqueando el suministro de energía y aumenta el H₂O₂

intracelular, incrementado las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva a activación de apoptosis. (8)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar acerca de las posibles terapias que puede generar la catálisis de la enzima Glucosa Oxidasa para un efectivo tratamiento contra el cáncer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer las características de la enzima Glucosa Oxidasa para su implementación como fármaco.

- Evaluar los distintos métodos de inmovilización y administración de la enzima Glucosa Oxidasa

- Realizar un seguimiento de las aplicaciones de la enzima Glucosa Oxidasa en terapia contra las células cancerígenas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 EFECTOS DE LA CATÁLISIS DE GOX SOBRE LA CÉLULA TUMORAL

Glucosa oxidasa (EC. 3.1.1.17) (GOX) es una flavoproteína que cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona y H_2O_2 usando oxígeno molecular como un aceptador de electrones esta reacción se puede dividir en una parte reductora y otra oxidativa. En la parte reductiva de la reacción, GOX cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona el cual es hidrolizado no enzimáticamente a ácido glucónico, posteriormente el anillo dinucleótido adenina flavina (FAD) es reducido a $FADH_2$. En la parte oxidativa la glucosa oxidasa reducida es nuevamente oxidada por el oxígeno generando H_2O_2 . El H_2O_2 es hidrolizado por catalasa (CAT) a oxígeno y agua. GOX es una glicoproteína dimérica que consta de dos subunidades de cadenas polipeptídicas idénticas unidas covalentemente a través de enlaces disulfuro. En la figura 1 se observa el grupo FAD y los residuos claves conservados en el sitio activo de una subunidad de GOX proveniente de *P. amagasakiense*, los residuos claves conservados en el sitio activo de la enzima son Tyr-73, Phe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 y His-563, donde Arg-516 es el aminoácido más crítico en la unión eficaz de β -D-glucosa por GOX, mientras que Asn-518 contribuye también pero en menor medida, los residuos aromáticos Tyr-73, Phe-418 y Trp-430 son importantes para la correcta orientación del sustrato, así como para alcanzar la velocidad máxima en la oxidación de la glucosa. His-520 y His-563 forman enlaces de hidrogeno con el 1-OH de la glucosa durante la reacción. El peso molecular de GOX varía aproximadamente de 130 a 175 kDa, la enzima es muy específica para el anómero β de D-glucosa, mientras que el anómero α no parece ser un sustrato adecuado. Se han observado actividades bajas de GOX al utilizar 2-deoxi-D-glucosa, D-manosa y D-galactosa como sustratos. Los inhibidores de la actividad de GOX son Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} , hidroxilamina, hidracina, fenilhidracina,

dimedona y bisulfato de sodio. (9) En la tabla 1 se puede observar un listado de organismos productores de la enzima.

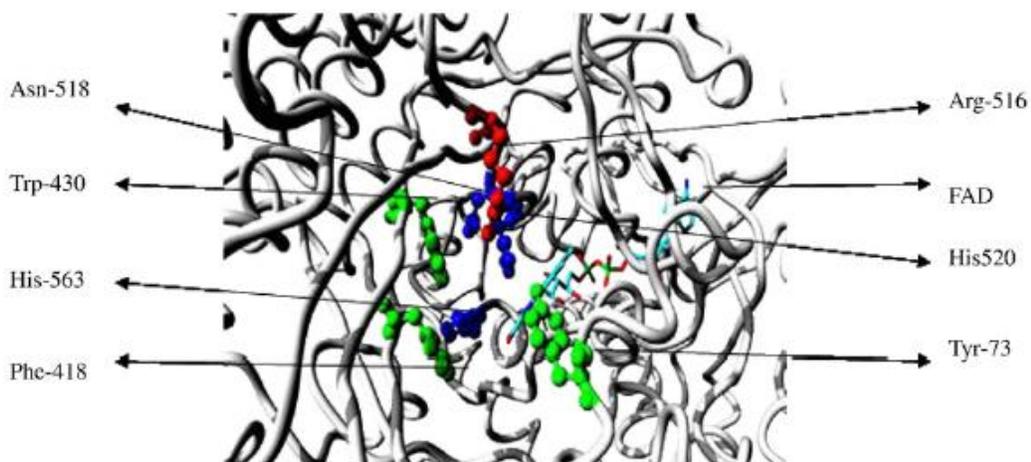


FIGURA 1: GLUCOSA OXIDASA DE *P. amagasakiense* MOSTRANDO LOS SITIOS DE FAD Y LOS RESIDUOS CLAVES DE LOS SITIOS ACTIVOS CONSERVADOS. Obtenido de Sandip B. Bankar, et al Glucose oxidase, An overview. El servier .2009 .27 (9)

El pH óptimo de la glucosa oxidasa varía entre 5,0 a 7,0. GOX en la mayoría de los hongos y levaduras tiene pH óptimo en el rango de ácido a neutro, como es el caso de *A. niger* y *P. crysogenum* que muestran un pH óptimo de 5,0 a 6,0. Por el contrario, el pH óptimo obtenido en GOX de *P.foniculosum* 433 y *P.canescens* es ligeramente alcalino, de 6,0 a 8,6. Por otro lado, la temperatura también influye en la actividad enzimática de GOX, reportándose que a partir de *P.foniculosum* 433 GOX tiene una temperatura óptima entre 25 y 30°C, mientras que GOX extraída de *A. niger* y *P.amagasakiense* es de 40 a 60°C. En cuanto a los parámetro cinéticos, la constante de Michaelis (Km) y la velocidad máxima (Vmax) para GOX fueron calculados por varios investigadores y encontraron ligeras diferencias en sus valores. El valor Km de la enzima de *T.favus* es 10,9 mM y es 33 mM para GOX obtenida a partir de *A. niger*. *P. amagasakiense* ATCC 28686 y *P. funiculosum* 433 muestra un valor de Km más bajo de 5,7 mM y 3,3 mM. (9)

Tabla 1: VARIADOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GOX.

Microorganismo	Composición del medio (g/L)	Método de ensayo	Rendimiento (unidad)
<i>Penicillium variable</i> P16	Glucosa 80; NaNO ₃ ,5; KCl,0.5; KH ₂ PO ₄ ,1; FeSO ₄ .7; H ₂ O,0.01; Peptona micológica, 1; CaCO ₃ , 35.	Reducción de benzoquinona por hidroquinona medido por la tasa de aumento de la absorbancia en 290 nm.	5,52 U ml ⁻¹
<i>A. niger</i> gen de glucosa oxidasa expresado en <i>S. cerevisiae</i> .	Medio dextrosa de peptona de levadura (YPD): Extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20.	Ensayo de placa: con o-dianisidina acoplada a la reacción de o-dianisidina-peroxidasa.	125 U ml ⁻¹
<i>Aspergillus niger</i> (BTL)	Sacarosa,70; (NH ₄) ₂ HPO ₄ ,0.4; KH ₂ PO ₄ ,0.2; MgSO ₄ .7; H ₂ O,0.2; Peptona, 10; CaCO ₃ ,35.	Reacción acoplada de de o-dianisidina-peroxidasa	75 U ml ⁻¹
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante	Extracto de levadura, 40; hycas, 5; glucosa, 20; galactosa, 30.	Reacción ABTS acoplada	3,43 U mg ⁻¹ masa de células secas
<i>Aspergillus niger</i> AM11	Glucosa,80; peptona,30; NaNO ₃ ,0.5; KH ₂ PO ₄ ,1; CaCO ₃ ,35.	Ensayo de reacción acoplada	2,5 U ml ⁻¹
<i>Penicillium pinophilum</i> DSM 11428	Sacarosa, 40; Na ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O, 4,45; KH ₂ PO ₄ , 1.5; NaNO ₃ , 1.9; MgSO ₄ , 7; H ₂ O, 0.2; CaCl ₂ , 2; H ₂ O, 0,02; extracto de malta, 10; levadura extracto, 5; Elemento traza, 10; vitamina, 10.	Acoplamiento ABTS –reacción de peroxidasa	1,9 U ml ⁻¹
<i>Aspergillus niger</i> ZBY-7	Glucosa, 150; sales inorgánicas, 0,35; caronato de metal, 35;	Trimétrico	6 U ml ⁻¹

Fuente Sandip B. Bankar, et al Glucose oxidase, An overview. El servier .2009. (9)

La función natural de la enzima está estrechamente relacionada con su actividad catalítica. Su principal funcionalidad es actuar como agente antibacteriano y antifúngico en los hongos e insectos que la producen a través de la producción de H₂O₂, el estrés oxidativo permanente se encarga de mantener bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno gracias a la continua actividad de la enzima, la que ha sido reportada en la literatura por ser muy eficaz contra el crecimiento de hongos y bacterias, especialmente si los microorganismos no contienen formas de eliminar dicho H₂O₂ como la catalasa. El desglose del peróxido de hidrógeno podría realizarse a través de una catalasa intrínseca generada por hongos o bacterias, sin embargo, esto no sería eficaz si el peróxido de hidrógeno se genera en forma constante por una enzima como la glucosa oxidasa. Otras

funciones naturales interesantes son la asistencia en la infección de las plantas, la degradación de la lignina y la reducción del pH en el medio ambiente, entre otras. (10)

La glucosa oxidasa (GOX) es una enzima involucrada en el metabolismo de la glucosa, puede catalizar la reacción de la glucosa, oxígeno y agua para generar H_2O_2 masivo y ácido glucónico. Por lo tanto, se puede utilizar GOX para amplificar el nivel de H_2O_2 en células tumorales, además el agotamiento concomitante de glucosa bloquearía el uso de nutrientes, contribuyendo a la terapia contra el cáncer. (11) En la figura 2, se observa las alternativas terapéuticas que otorga la enzima de acuerdo al consumo de ciertos metabolitos como a la producción de otros, lo que contribuiría en diferentes terapias contra células cancerosas. Mientras que el consumo de glucosa mediado por GOX proporciona una estrategia alternativa no invasiva para la terapia del cáncer por restricción energética, privando a las células cancerosas de nutrientes, el consumo de oxígeno mediado por GOX aumenta la hipoxia tumoral, y por tanto, puede activar profármacos de hipoxia para quimioterapia contra el cáncer. La obtención de ácido glucónico también se utiliza para aumentar la acidez del microentorno del tumor, desencadenando la liberación de un fármaco desde un portador sensible al pH. La producción de H_2O_2 no solo aumenta notablemente el estrés oxidativo del tumor, también puede convertirse en un radical hidroxilo para eliminar células cancerosas bajo irradiación con luz o a través de la Reacción de Fenton. (12)

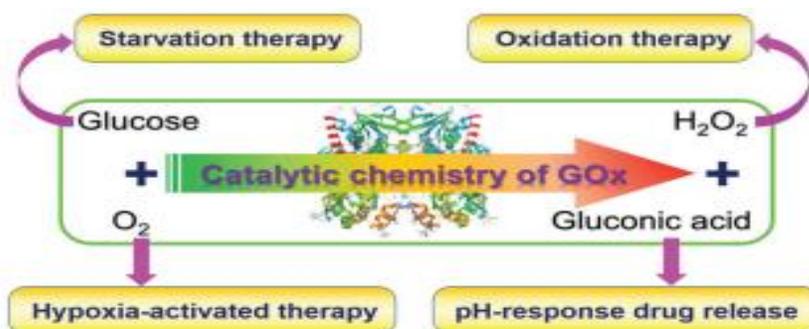


FIGURA 2: FUNDAMENTOS DE ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS BASADAS EN GOX. Obtenido de Lian-Hua Fu, et al. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cáncer diagnosis and treatment. Chem. Soc. Rev 2018 vol 47 (17)

A pesar de tener todas estas propiedades se ha concluido que GOX tiene una estabilidad deficiente, vida media corta *in vivo* además de inmunogenicidad y toxicidad sistémica, pero el mayor problema es regular la producción de H_2O_2 después de la administración exógena de GOX en hospederos con tumores, esto se debe a que los sustratos de GOX (glucosa y oxígeno) están en todas partes del cuerpo, lo que da como resultado la generación sistémica de H_2O_2 y por tanto, induciría efectos secundarios sistémicos graves. (13) Se ha probado en distintos estudios que el efecto terapéutico de GOX solo es limitado, por lo tanto, la tendencia actual de uso de GOX en cáncer ha sido cambiada de monoterapia a terapia sinérgica para mejorar el tratamiento convencional; (14) ya que puede generar la continua supresión tanto de nutrientes como oxígeno en los capilares, además de la adaptación de las células tumorales para utilizar suministros de energía paralelos, por lo tanto, debería ser usada en combinación con otros medios terapéuticos. (11) Los principales problemas que conllevaría la utilización de GOX como tratamiento contra las células tumorales serían primero, que la eficacia del agotamiento de la glucosa dependiente de O_2 estaría limitada por la hipoxia tumoral que se desarrolla a partir de la proliferación irregular de células cancerosas y con ello la formación de vasos sanguíneos distorsionados; segundo, el agotamiento de O_2 durante la reacción de agotamiento de la glucosa también agravaría la hipoxia tumoral, lo que restringiría aún más la eficiencia de la privación de glucosa como un círculo vicioso; en tercer lugar existe un problema no menos importante que son los productos secundarios de H_2O_2 y ácido glucónico generados por la reacción empeoraría el microentorno tumoral y podría fomentar la metástasis. Por último, a pesar de que genera una disminución en la glucosa, la acidosis por si sola podría prolongar significativamente el tiempo de supervivencia del tumor mediante la inducción de la autofagia y debilitar aún más la eficacia de la terapia. (15)

4.1.1 TERAPIA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA DE CÉLULAS TUMORALES

La glicólisis hace referencia a la ruta metabólica por la cual la glucosa (compuesto orgánico de 6 carbonos) es degradada en una serie secuencial de diez reacciones enzimáticas para dar dos moléculas del compuesto de tres carbonos piruvato. Se considera a esta vía como clave, o incluso la única en determinados tipos celulares para la obtención de energía, conservándose en este proceso parte de la energía libre liberada a partir de glucosa en forma de ATP y NADH. Funciona en ausencia de O₂ (anaerobiosis), y está altamente conservada tanto en el número como en los mecanismos implicados en la mayoría de los organismos. La demanda energética, la regeneración del NAD⁺, los niveles de ciertos metabolitos considerados claves y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) permiten ajustar el flujo o promover el proceso inverso. (16) Las células tumorales se caracterizan por un aumento en la captación de glucosa para generar mayoritariamente lactato aun en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg o glicolisis aerobia, como se observa en la figura 3. En este efecto se ha implicado a reguladores de la expresión génica como el factor inducible por hipoxia HIF-1, la proteína supresora de tumores p53 o el oncogén c-Myc, así HIF-1 incrementa la expresión de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3, la síntesis de enzimas glicolíticas como Hexokinasa 1 y 2 (HK1 y HK2), fosfoglicerato kinasa1 o la isoforma M2 de Piruvato kinasa y la producción de lactato y su transporte al espacio extracelular por la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) A y del transportador MCT4. Mutaciones en p53 conllevan, entre otras cosas a una deficiencia en la función mitocondrial, la consecuente reducción de la respiración celular e incremento en ROS, junto a la desactivación de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial, responsable de la conversión de piruvato en acetil-CoA, HIF-1 refuerza la mayor dependencia de la glicólisis para la obtención de energía. Estas alteraciones conferirían una ventaja selectiva para la supervivencia y proliferación tumoral. (17)

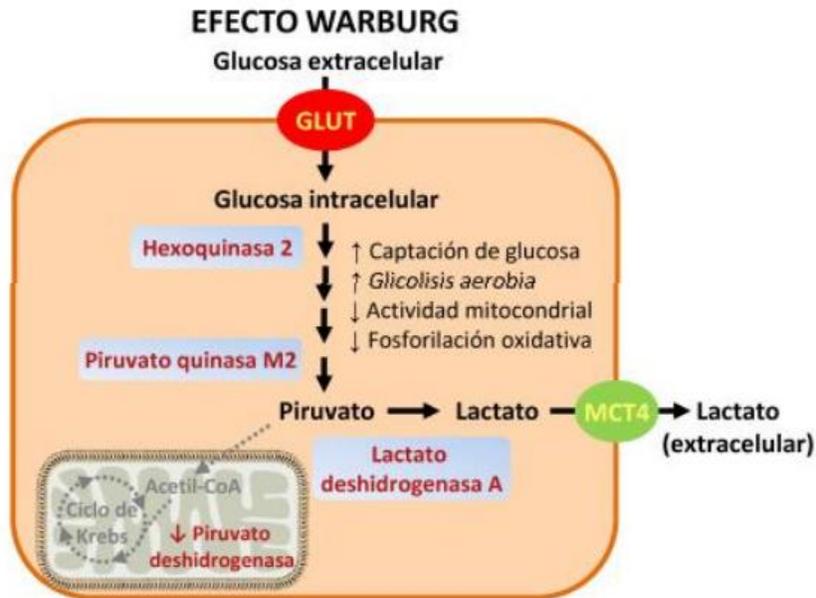


FIGURA 3: EFECTO WARBURG. Obtenido de Oscar H. Martínez-Costa, Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. Sebbm. 2015.

El principio de dirigirse al metabolismo energético como una estrategia antitumoral se basa en las diferencias en las formas en que las células normales y cancerosas generan energía. A diferencia de las células no neoplásicas, las células tumorales presentan una alta demanda de glucosa con una flexibilidad muy limitada para modificar sus medios de generación de ATP en respuesta a las condiciones ambientales cambiantes y la disponibilidad de la fuente de energía. Por lo tanto, las células cancerosas son exquisitamente vulnerables a la restricción de energía. La investigación ha demostrado que la restricción de energía suprime la expansión clónica de las células transformadas al limitar los factores de supervivencia necesarios para la regulación de la proliferación celular, el control del ciclo celular y la angiogénesis (18) Durante la terapia de restricción energética, nutrientes esenciales y suministros de energía tales como el oxígeno y la D-glucosa se consumen, lo que resulta en detener el crecimiento y la proliferación de las células cancerígenas. (11) Según Future Medicine (18) las alternativas de esta terapia más estudiadas son:

Activadores de AMPK: AMPK es una proteína kinasa activada por AMP. Los agentes que activan AMPK imitan un estado de energía intracelular baja e inhiben la proliferación de células cancerosas *in vitro*. Los activadores de AMPK suprimen el crecimiento de las células cancerosas inhibiendo el inicio de la traducción dependiente de mTOR o mediante la fosforilación e inactivación de acetil-CoA carboxilasa lo que se acompaña de la supresión de la sintasa de ácidos grasos, inhibiendo el crecimiento al bloquear la lipogénesis.

Derivados de tiazolidindona: Son agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisoma los que imitan la inanición de glucosa celular. Las respuestas asociadas a estos incluyen la reducción de las tasas glucolíticas y los niveles intracelulares de NADH y lactato, la activación de AMPK y el estrés del retículo endoplásmico. La interacción entre estas respuestas es probablemente culmine en la autofagia y apoptosis.

Inhibidores de la hexokinasa II: La hexokinasa II es la primera enzima de la glucólisis, es capaz de reforzar el suministro de energía de las células malignas y proteger las células cancerosas contra la apoptosis a través de la interacción directa con el canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial (VDAC1). Los inhibidores de la HK II unida a las mitocondrias, como la lonidamina, sensibilizan las células cancerosas a la apoptosis al facilitar el acoplamiento de la proteína pro-apoptótica Bax en VDAC1.

Recientemente se ha investigado una forma alternativa de restricción de energía para las células tumorales a través del uso de la enzima glucosa oxidasa. La enzima GOX puede consumir glucosa oxidándola en ácido glucónico y generar peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno, lo que lo convierte en un fármaco potencial para terapia de

restricción de energía contra el cáncer, sin embargo la eficacia de esta terapia está limitada por la deficiencia de oxígeno en el microentorno del tumor hipóxico, además el suministro continuo de glucosa a través de los capilares alrededor del tumor también hace que sea difícil eliminar los tumores por agotamiento de la glucosa sólo con la enzima GOX. (19)

4.1.2 TERAPIA DE OXIDACIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\bullet$), consisten en especies de oxígeno radicales y no radicales formadas por la reducción parcial de oxígeno. Las ROS celulares se generan endógenamente como en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, o pueden surgir de interacciones con fuentes exógenas como los compuestos xenobióticos. Cuando las ROS superan al sistema de defensa antioxidante celular, ya sea a través de un aumento en los niveles de ROS o una disminución de la capacidad antioxidante celular, se produce un estrés oxidativo. El estrés oxidativo da como resultado un daño directo o indirecto de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos mediado por ROS, y se ha relacionado con la carcinogénesis, neurodegeneración, aterosclerosis, diabetes y envejecimiento. (20) La interacción de diversas macromoléculas con ROS puede perjudicar la función de estos orgánulos y puede influir directamente en la viabilidad celular y desencadenar la muerte celular. La p53, un jugador clave en el mantenimiento de la integridad del genoma, está también involucrada en la regulación redox celular. La interacción de ROS con ADN, pueden provocar daños en este lo que induce la estabilización de p53, el aumento resultante de la actividad de p53 desencadena la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, BAX y PUMA que se dirigen a la mitocondria para inducir la liberación de citocromo c y posterior activación de cascada de caspasas. Dependiendo del nivel de la proteína p53, y el nivel de PUMA y BAX, la acumulación de ROS puede conducir a la inducción de la apoptosis o estado de senescencia. (21)

La terapia de oxidación se basa en el exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2$ y oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ para aumentar significativamente el estrés oxidativo de las células tumorales y así provocar la muerte celular. Conforme a las diferentes formas de generar ROS la terapia de oxidación puede ser a través del uso del oxígeno singlete citotóxico que es producido por fotosensibilizadores cuando la energía se transfiere desde su estado excitado a O_2 bajo radiación de luz, induciendo la muerte celular. Otra forma es a través de las especies reactivas de oxígeno que son generados a partir de un sensor de sensibilidad por la cavitación activada por ultrasonido que causa luminiscencia o el proceso de pirólisis para generar muerte celular. Además se puede generar oxidación por la reacción de desproporción con H_2O_2 a través de una reacción intratumoral de fenton o similar a fenton para generar $\cdot\text{O}_2$ citotóxico lo que desencadena la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral. (14) Es aquí donde la enzima glucosa oxidasa también causa interés, ya que además de que consume glucosa intratumoral, bloqueando el suministro de energía, aumenta simultáneamente los niveles de H_2O_2 para eliminar las células cancerosas, lo que conduce a la aparición de un nuevo paradigma de terapia sinérgica contra el cáncer por restricción energética a las células tumorales junto con la oxidación de las mismas. (13)

4.1.3 TERAPIA DE HIPOXIA

En la proliferación intensiva y la expansión del tejido tumoral, el suministro de oxígeno se ve superado por la demanda de oxígeno, y la distancia entre las células y la vasculatura existente aumenta lo que dificulta la difusión de oxígeno y crea un entorno aún más hipóxico. En general se acepta que el nivel de oxígeno en los tejidos tumorales hipóxicos es inferior a la oxigenación de los tejidos normales respectivos y en promedio se encuentra entre el 1-2% inferior de oxígeno. (22) El problema está en que la hipoxia confiere resistencia al tratamiento de las células cancerosas al regular procesos como i) inducir la detención del ciclo celular (quiescencia), un estado de proliferación celular reducida que protege a las células del estrés externo, ii) inhibir la apoptosis y la senescencia de las

células, iii) control de la autofagia, p53, y actividad mitocondrial. Aparte de las adaptaciones celulares influenciadas por la hipoxia, la oxigenación reducida del tejido tumoral confiere quimiorresistencia al afectar iv) la administración de fármacos y la captación celular a través de la acidez asociada y la expresión de la bomba de flujo de salida de medicamentos, como P-gp, y también por v) la falta de oxígeno requerido para la citotoxicidad de varios quimioterapéuticos. (22)

Los tumores sólidos se caracterizan por un ambiente hipóxico, debido a su rápido crecimiento y vasos sanguíneos distorsionados en los tejidos tumorales. La hipoxia hace que los tejidos sólidos sean altamente resistentes a quimioterapia convencional y radioterapia, ya que las células tumorales están virtualmente aisladas del suministro de sangre y la mayoría de los fármacos contra el cáncer no pueden alcanzar las regiones hipóxicas. La terapia de la hipoxia se puede utilizar para activar agentes terapéuticos hipoxia-sensibles para el tratamiento del cáncer. La catálisis de GOX consume oxígeno en los tejidos tumorales, aumentando la hipoxia, por lo tanto es un potencial activador de profármacos activados por hipoxia para un tratamiento eficaz de la quimioterapia contra el cáncer. (12)

Los profármacos activados por hipoxia se activan por una reducción enzimática ante baja tensión de oxígeno detectando la hipoxia del tumor. Estas moléculas se pueden separar de acuerdo al umbral hipóxico requerido para la activación de la reductasa específica. Bajo extrema hipoxia los profármacos radicales tienen vidas más largas y se pueden reducir más fácilmente a drogas activas. La mayoría de los metabolitos activados por hipoxia producen un daño en el DNA al interferir con la replicación de este. (23) La mayoría de los profármacos que cumplen su función bajo condiciones de hipoxia se convierten en citotóxicos por un metabolismo reductivo. Inicialmente esto se logra gracias a diferentes enzimas reductoras que se encuentran en las células, en la figura 4 se observa el mecanismo

principal de activación de profármacos, donde se genera un producto intermediario transitorio tempranamente en la reacción de reducción, el que generalmente contiene un electrón, este es capaz de ser oxidado de manera eficiente por el oxígeno presente en las células generando el profármaco principal. Existen otros casos también, como se observa en la figura, donde los profármacos compiten en el sitio activo de la enzima metabolizante con el oxígeno. (24)

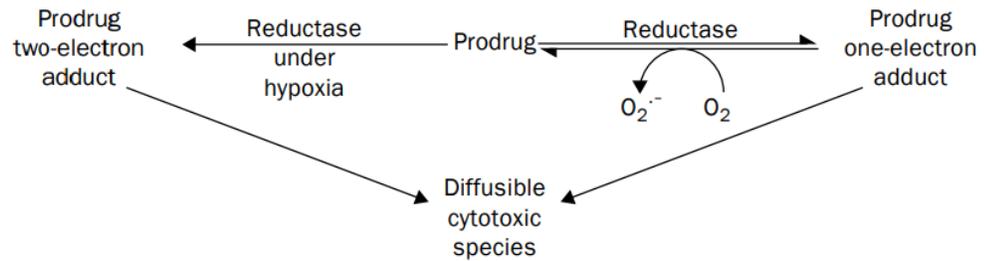


FIGURA 4: MECANISMO DE ACITVACIÓN DE FÁRMACOS ACTIVADOS POR HIPOXIA. Obtenido de William A Denny, The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. The lancet Oncology. 2000 Vol 1

4.2 FARMACOCINÉTICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA

Los agentes bioterapéuticos son agentes terapéuticos que se producen a partir de organismos vivos o sus productos (incluida la tecnología de ADN recombinante, la fabricación biotecnológica y la síntesis química utilizando nucleótidos o aminoácidos) e incluyen anticuerpos monoclonales (mAbs), fragmentos de anticuerpos, péptidos, factores de reemplazo, proteínas de fusión, oligonucleótidos y preparaciones de ADN para terapia génica, así como vacunas. Esta es una clase de terapias en rápido crecimiento para un amplio espectro de indicaciones, que van desde la oncología y la autoinmunidad hasta las enfermedades huérfanas y genéticas. La farmacocinética (PK) se refiere a los procesos biológicos que determinan la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de un fármaco en un organismo. La farmacodinámica (DP) se refiere a la acción del fármaco en un organismo vivo, incluida la respuesta farmacológica y la duración y magnitud de la respuesta observada en relación con la concentración del fármaco en un sitio activo en un organismo. Se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de PK, PD, así como los perfiles de toxicidad de los agentes bioterapéuticos en animales y humanos, especialmente para proteínas y mAbs, que han estado en desarrollo comercial durante más de tres décadas. (25)

En los últimos años, las proteínas y las enzimas se han convertido en terapias prometedoras como resultado de los avances en biotecnología e ingeniería genética. Más de 300 medicamentos basados en proteínas han sido aprobados para su comercialización, están en ensayos clínicos en humanos o están bajo revisión por las agencias reguladoras. Sin embargo la degradación ácida y/o enzimática en el tracto gastrointestinal después de la administración oral o su corto tiempo de circulación y vida media biológica luego de la inyección intravenosa otorgan limitantes extremos para su aplicación. (26) Los avances en la biotecnología en los últimos años han permitido a las compañías farmacéuticas generar

productos enzimáticos más seguros, más baratos y con potencia y actividad mejorada, junto con estos avances, cambios en las leyes de drogas y nuevas iniciativas de la FDA han sido eficaces facilitando los esfuerzos para desarrollar fármacos enzimáticos, esta sinergia ha tenido un efecto beneficioso en el desarrollo de tratamientos para enfermedades raras y comunes, como se observa en la figura 5. (27)

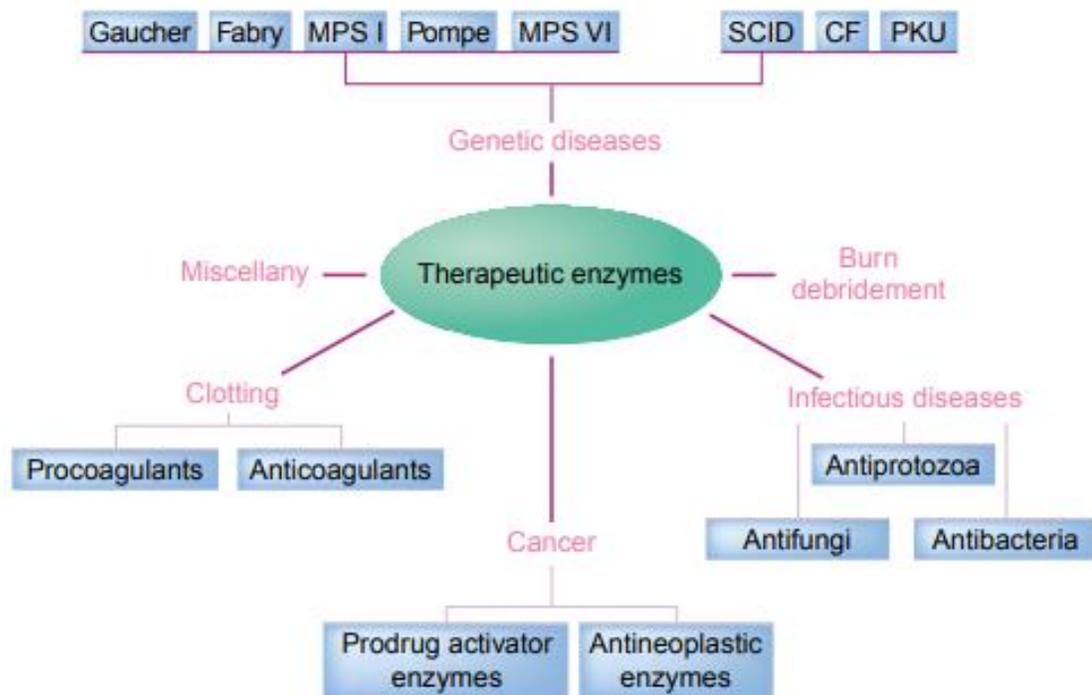


FIGURA 5: DESÓRDENES Y ENFERMEDADES EN LOS QUE SE UTILIZAN LAS ENZIMAS TERAPÉUTICAS. Obtenido de Michel Vellard. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Elsevier. 2003. Vol 14 (4).

En este aspecto, Manish K. Dubey junto con sus colaboradores, entregan una visión detallada acerca de la enzima Glucosa Oxidasa, respecto de su mecanismo de acción y las condiciones apropiadas que se necesitan para llevar a cabo la catálisis, además de los microorganismos de los cuales se puede extraer. En la investigación se establece que la aplicación a gran escala de GOX extraída de cepas fúngicas naturales se ha visto obstaculizada por la baja capacidad de fermentación, proceso de purificación complicado y la baja eficiencia del mismo, además las deficiencias en la aplicación de GOX están asociadas con una impureza en el proceso de extracción incluyendo catalasa, celulasa y amilasa. Además se debe tener en cuenta que en la catálisis de la enzima, por la

acumulación de H_2O_2 GOX puede sufrir una inactivación, esto porque el H_2O_2 se acumula durante la reacción de oxidación, seguido de una reducción del pH por la descomposición de D-glucono- δ -lactona a ácido glucónico inhibiéndose la producción de la enzima. Por otro lado, se dice que la idoneidad para trabajar con una enzima industrialmente, debe tener ciertas características como estabilidad térmica y confiabilidad en diferentes medios; en caso de GOX su expresión en estado nativo no es alto, pero gracias a la ingeniería genética se han desarrollado las estrategias para su producción a gran escala. (28) En la tabla 2 se definen las características de la enzima Glucosa Oxidasa extraída desde *Aspergillus niger*, uno de las principales fuentes de GOX para su utilización industrial.

Michael Zamuzuk, et al en 1993 es uno de los promotores en los conocimientos acerca de la farmacocinética de la enzima glucosa oxidasa, ya que a pesar de que se sabía de algunas de sus propiedades, no se sabía sobre su toxicología ni su forma de actuar en el organismo. Este dedujo que las reacciones químicas catalizadas por la glucosa oxidasa sugieren que las principales toxicidades limitantes de la dosis de la glucosa oxidasa serán la hipoglucemia, la hipoxemia y la metahemoglobinemia debido a la oxidación del hierro en la hemoglobina con peróxido de hidrógeno. Además, es probable que la glucosa oxidasa conjugada y no conjugada se elimine bruscamente de la sangre debido a que el peróxido de hidrógeno aumenta reversiblemente la transferencia de proteínas a través del endotelio. (29) Una de las mayores complicaciones es la producción extratumoral de H_2O_2 , ya que es difícil modular la generación de este luego de la administración intratumoral de la enzima, lo que puede conducir a una eficacia antitumoral limitada o por otro lado, efectos sistémicos graves, para evitar esto se han diseñado muchos sistemas de entrega de GOX. (30)

Tabla 2: PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE GOX EXTRAÍDA DE *A.nigger*

Características	Propiedades
Localización	Intracelular y extracelular
Estructura 3D	Flavoenzima homodimérica con dos subunidades idénticas de 80 Kda, con 25-60% de glicosilación. Serina, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico y alanina constituyen más del 60% del total de aminoácidos
Fuentes de carbono y nitrógeno preferidas para la producción	Glucosa, sacarosa, melaza, licor de maíz.
Otros componentes de medios preferidos para la producción	n-dodecano, n-hexadecano, aceite de soja, , fosfato amónico, ortovanadato de sodio, hematina, colina y tween 80.
Inductores	Glucosa, carbonato de calcio, magnesio, cobalto, ácido tioglicólico, ácido glicólico, EDTA y algunos metales iónicos como Zn ⁺² y Fe ⁺²
Inhibidores	Ag ⁺ , Hg ⁺ , Cu ⁺² , Mg ⁺² , iones de CaCl ₂ , acumulación de peróxido de hidrógeno, arseniato, p-clocromercuriobenzoato, fenilmercurio benzoato, hydroxilamina, fenilhidrazina, dimedone, bisulfto de sodio, hidroclohidrato de guanidina, urea, SDS.
Tensión mejorada	Radiación gamma, radiación UV, mutacion aleatoria, screening, mutagénesis, fusión de protoplastos, mutagenesis dirigida, modificación química, mutación bioquímica.
Glucosa Oxidasa recombinante	<i>H.polymorpha</i> , <i>S.cerevisiae</i> , <i>T.reesei</i> , <i>P.pastoris</i> , <i>P.nalgiovense</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. nigger</i> .
Optimización por métodos estáticos	Metodología de superficie de respuesta, diseño experimental Taguchi L27, diseño de plakett-burman
Técnicas de purificación	Precipitación por sulfato de amonio, filtración en gel, Q-sefarosa y DEAE-sefarosa, intercambio iónico de celulosa DEAE, cromatografía de exclusión de tamaño Sephadex G-200
Vida media	Aproximadamente 30 min a 37°C. GOX inmovilizada es más efectiva para aplicaciones a 37°C, alcoholes plihídricos como etilenglicol, glicol, glicerol, eritritol, xilitol, sorbitol,, polietilenglicol. Los liofilizados de GOX serán estables por al menos 6 meses a -20°C.

Fuente: Manish K. Dubey, et al. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose GOD): Current Updates . Frontiers in microbiology Oxidase . 2017

4.2.1 UTILIZACIÓN DE HIDROGELES COMO VEHÍCULO DE GOX EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Los geles hidrofílicos que generalmente se denominan como hidrogeles son redes de cadenas de polímeros que algunas veces se encuentran como geles coloidales en los cuales el agua cumple la función de la dispersión del medio. Los investigadores a lo largo de los años, han definido los hidrogeles de muchas maneras diferentes, la más común de estas definiciones es que el hidrogel es una red polimérica reticulada, hinchada por el agua y entrecruzada producido por la simple reacción de uno o más monómeros. Otra definición es que es un material polimérico que exhibe la capacidad de hincharse y retener una fracción significativa de agua dentro de su estructura pero, a su vez, insoluble en agua. Poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural debido a su gran contenido de agua. La capacidad de los hidrogeles de absorber agua surge de grupos funcionales hidrofílicos unidos a la columna vertebral polimérica, mientras que su resistencia a la disolución surge de los enlaces cruzados entre las cadenas de la red. (31) La modificación de polímeros funcionales con biomoléculas puede mejorar las propiedades como la estabilidad, la solubilidad y la biocompatibilidad, por ejemplo se ha demostrado que la conjugación de proteínas con polietilenglicol (PEG) aumenta significativamente los tiempos de circulación *in vivo*, la PEGilación también puede aumentar la estabilidad de la proteína *in vivo* al reducir la susceptibilidad a las enzimas proteolíticas y anticuerpos, por lo que en los últimos años se han realizado investigaciones en esta área y se han logrado grandes avances en medicina y biotecnología. El PEG es un polímero soluble en agua con excelentes propiedades como hidratación extensa, buena flexibilidad de estructuración, movilidad de la cadena y adaptación a gran volumen, por lo tanto PEG se usaría como una excelente cadena flexible para unir enzimas, mejorando la rigidez y estabilidad de esta. Además tiene una excelente solubilidad en agua y solventes orgánicos, no muestra toxicidad, inmunogenicidad ni antigenicidad y se consume en el cuerpo humano según lo aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (38) Es por lo anterior que Gökyay Vardar decide realizar una inmovilización de la enzima Glucosa Oxidasa en un

polímero compuesto de PEG, donde la enzima se modificó mediante enlaces covalentes que se produjeron entre grupos aldehído de derivados de PEG y grupos aminos de moléculas de la enzima, logrando generar una cubierta alrededor de la superficie de la enzima para hacerla más resistente a las condiciones ambientales. El polímero elegido debe ser reactivo hacia los grupos ubicados en la superficie de la enzima. La aplicación de la conjugación covalente de GOX mejora la estabilidad térmica y el perfil de inactivación de la actividad enzimática. Todos estos hallazgos contribuyen en futuros estudios sobre la aplicación de la enzima en procesos industriales como la industria alimentaria, la biomedicina y la biotecnología. (38) Así se demuestra en la investigación realizada por Camron S. Dawes y sus colaboradores, quienes presentan una estrategia de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para inducir hipoxia *in vitro* en un cultivo de células tumorales, así la glucosa oxidasa unida al hidrogel covalentemente proporciona un método fácil para controlar la tensión parcial de oxígeno sin utilizar dispositivos externos, además los hidrogeles con la enzima inmovilizada pueden ser agregados y quitados de los cultivos celulares sin alterarlos, GOX fue capaz de mantener condiciones hipoxicas ($O_2 < 5\%$) incluso cuando el sistema se mantuvo expuesto al aire por entre 6 a 24 horas. Los problemas radican en el que el hidrogel a pesar de retener y estabilizar la enzima durante al menos 5 días, el suministro de oxígeno desde el aire supera la capacidad de consumo por parte de la enzima, además la acumulación de los subproductos de la reacción y el agotamiento de la glucosa podrían limitar la utilidad del sistema a 24 horas. A pesar de lo anterior, la inmovilización de GOX en un polímero de PEG proporciona una opción simple y eficiente para inducir hipoxia en las células tumorales en comparación con otros compuestos químicos. (39)

La propiedad indispensable de un vehículo enzimático en la terapia contra el cáncer es atrapar las enzimas no solo para retenerlas alrededor de las células tumorales y mejorar la biodisponibilidad, sino que también que protejan las enzimas para que mantengan su actividad, lo que permite un tratamiento continuo. Los hidrogeles supramoleculares inyectables y autorecuperables, incluidos los basados en péptidos, son una plataforma prometedora particular debido a su alta similitud estructural con la matriz extracelular, que podría ofrecer un entorno ideal para la catálisis enzimática. Trabajos previos han

demostrado que las enzimas integradas en un microentorno de gel optimizado mantienen su alta actividad catalítica, incluso la superactividad. Para mejorar las propiedades antidegradables como vehículos biomédicos, los hidrogeles peptídicos podrían estar entrecruzados covalentemente con polisacáridos y polímeros sintéticos, por esto Qingcong Wei desarrolla un hidrogel peptídico mejorado mecánicamente mediante el uso de una reacción de reticulación de oxígeno singlete *in situ*, a través de una solución precursora que contiene Cloroperoxidasa y Glucosa Oxidasa además de un oligopeptido funcionalizado con furoyl y un derivado que es furoyl glicol quitosano, esta solución es capaz de formar *in situ* hidrogeles en los tumores para que las enzimas encapsuladas utilicen oxígeno, glucosa y cloruro en la sangre para generar continuamente oxígeno singlete, lo que resulta en una apoptosis efectiva de las células cancerosas. En la figura 6 se observa la combinación de dos enzimas reductoras como GOX y cloroperoxidasa (CPO) que realizan una reacción en cascada con el fin de generar oxígeno singlete de forma controlada. Esto porque GOX va a oxidar la glucosa para elevar los niveles de H_2O_2 el que puede ser utilizado por el sistema CPO- H_2O_2 -Cloruro para regular los niveles de oxígeno singlete. Se prepara un oligopéptido funcionalizado con furoyl de glicol quitosano (Nap-FFK Furoyl) y un furoyl derivado de glicol quitosano (GCF). El hidrogel peptídico con propiedades mecánicas mejoradas se fabricó a través de la reticulación, gracias al oxígeno singlete, *in situ* catalizado por el sistemas de enzimas en tándem GOX-CPA, que no solo permite la rápida encapsulación de las enzimas durante la gelificación en lugar de difundirlas en los tejidos normales, sino que también permite el suministro a través de jeringas en tumores. Además la solución precursora que contiene CPO, GOX, Nap-FFK furoyl y GCF son capaces de generar geles *in situ* en tumores, de modo que la GOX y CPO utilizan el oxígeno de la sangre, el cloruro y glucosa para la generación continua de oxígeno singlete, lo que resulta en una apoptosis efectiva de células cancerosas. Además el consumo de glucosa y oxígeno por parte de GOX probablemente hace que las células cancerígenas mueran por falta de nutrientes, mejorando la eficacia de la terapia. (40)

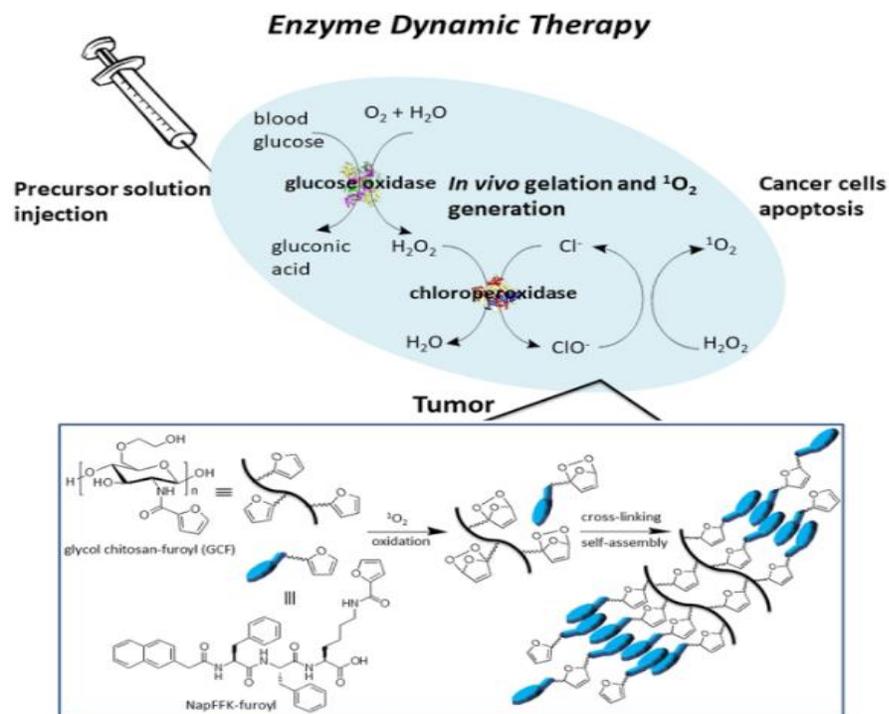


FIGURA 6: ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE HIDROGEL HÍBRIDO CON DOS ENZIMAS (GOX Y CPA) PARA LA PRODUCCIÓN DE OXIGENO SINGLETE A TRAVÉS DEL ENTRECRUZAMIENTO DE NAPFFK-FUROYL Y GFC. Obtenido de Quingcong Wei, et al. *Injectable Peptide Hydrogel Enables Integrated Tandem Enzymes' Superactivity for Cancer (34) Therapy.*

En otra investigación realizada en 2019 por Hanhun Jao, se establece el uso de la enzima glucosa oxidasa en terapia contra el cáncer tanto para controlar la producción de H_2O_2 en la terapia de restricción energética, como para la producción del mismo para atacar las células tumorales. En el estudio se presenta el crecimiento *in situ* (SIG) de un polímero de GOX para modular la generación de H_2O_2 para las terapias antes mencionadas contra el cáncer. Se desarrolla un polímero catiónico de poli(N, N'-dimetilamino-2-etilmetacrilato) (PMDA) que fue polimerizado desde el extremo N de GOX a través de la polimerización por radicales de transferencia atómica (ATPR), generando GOX-PMDA, como se observa en la figura 7, este debería tener mayor toxicidad contra las células tumorales ya que se cargaría positivamente, a diferencia de GOX libre que posee carga negativa, generándose atracción electrostática entre GOX-PMDA y las células cancerosas de carga negativa.

Además el conjugado mostraría una mayor retención luego de la inyección intratumoral debido a su aumento de tamaño, mayor estabilidad y la atracción electrostática en comparación con la enzima libre. Al ser inyectado a un modelo de ratón de cáncer de colon, GOX-PMDA mostró una erradicación completa del tumor, con una tolerabilidad mejorada, sin efectos secundarios detectables, mientras que GOX libre fue inefectivo y sistémicamente tóxico. (30)

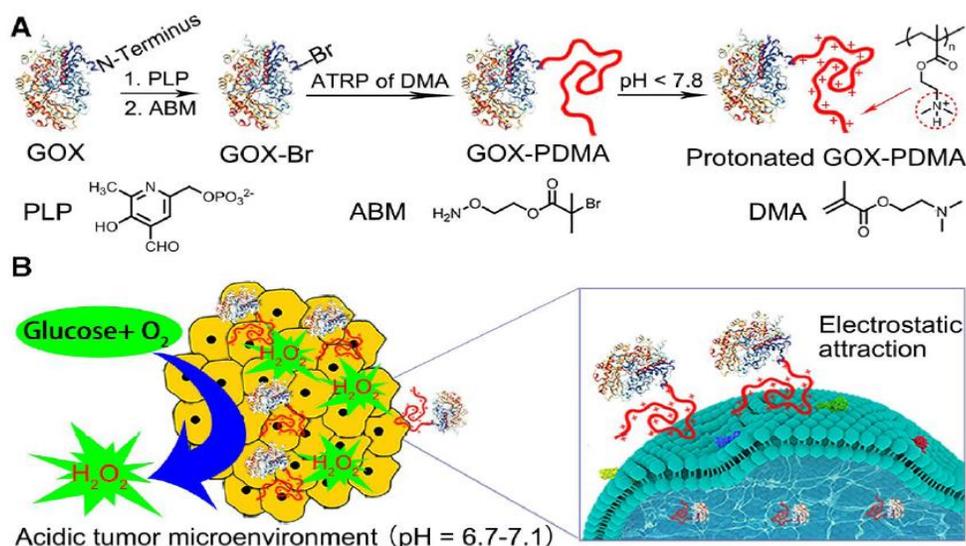


FIGURA 7: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL DESARROLLO DE PDMA DESDE EL GRUPO N-TERMINAL DE GOX PARA LA OBTENCIÓN DE CONJUGADOS GOX-PDMA ESPECÍFICOS PARA LA TERAPIA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA Y DE H₂O₂. Obtenido de Hanjun Hao, et al. In situ growth of a cationic polymer from the N-terminus of glucose oxidase to regulate H₂O₂ generation for cancer starvation and H₂O₂ therapy. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. (30)

Si bien el efecto de la enzima Glucosa Oxidasa sobre las células tumorales es relativamente conocido, el problema radica en encontrar la mejor y precisa forma de administrarla para lograr así una terapia efectiva y baja toxicidad, en la misma búsqueda Soumik Dinda y sus colaboradores diseñaron un sistema de vesícula por su alta capacidad de carga y buena biocompatibilidad para la administración de GOX en células tumorales con el fin de realizar la terapia de restricción energética. Para esto se sintetiza una vesícula de ácido trímico a partir de triskeilon anfifílico biotinilado en agua pura (TMBvesicles) las cuales son entregadas selectivamente en tipos de células cancerosas como HeLa y B16F10. La muerte de las células cancerosas fue seis veces mayor en comparación con las células de

tipo no cancerosas (CHO, NIH3T3), lo que indicaría que la terapia de restricción energética a partir de vesículas transportadoras de glucosa oxidasa es efectiva y específica. En la figura 8 se muestra en un principio como se sintetiza el sistema de vesícula, donde se realiza una trifusión de ácido trímico con biotina y el resto lineal de polietilenglicol (PEG), se utiliza biotina porque las células cancerosas sobreexpresan receptores para este compuesto, por lo que las vesículas tendrían mayor especificidad, luego se encapsula la enzima glucosa oxidasa, la cual genera una mayor actividad al compararla con la glucosa oxidasa libre. Además se puede observar el proceso de entrada de las vesículas de TMB a las células cancerosas a través del reconocimiento de biotina por los receptores, se realiza la catálisis por la enzima GOX consumiendo glucosa y oxígeno para generar ácido glucónico y H_2O_2 y como finalmente la célula tumoral muere. (41)

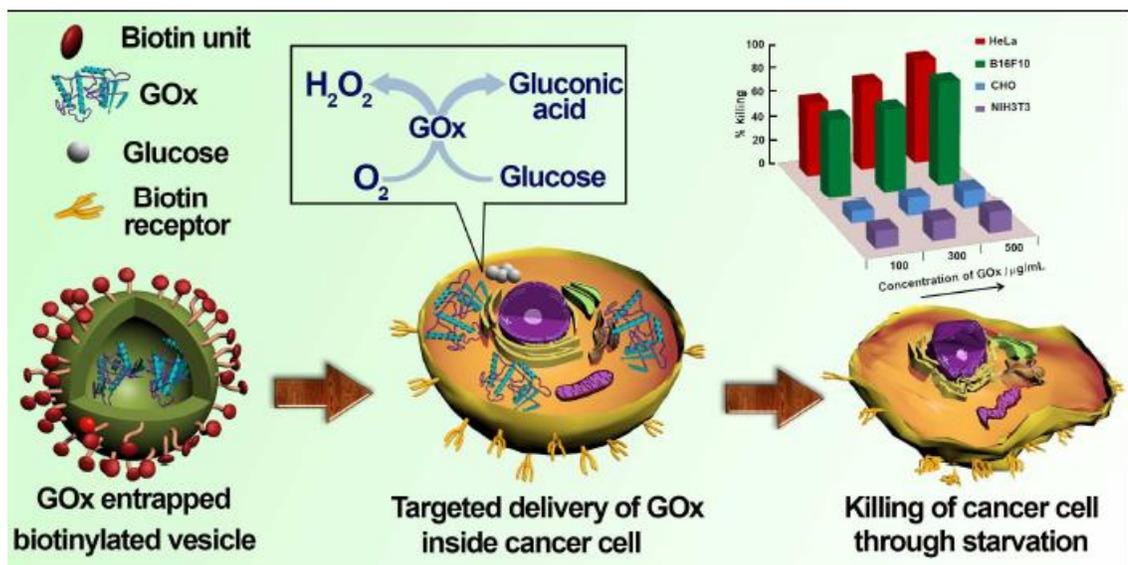


FIGURA 8: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA GENERACIÓN Y EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LAS VESÍCULAS DE TMB A LAS CÉLULAS TUMORALES PARA LA TERAPIA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA. Obtenido de Soumik Dinda, Saheli Sarkar and Prasanta Kumar Das. Glucose Oxidase Mediated Targeted Cancer-Starving Therapy by Biotinylated Self-Assembled Vesicle. Royal Society of Chemistry. 2018. (35)

Por otro lado existen investigaciones acerca de nanogeles, los que se han utilizado como transportadores para la administración de fármacos pero no se han explorado en proteínas terapéuticas por formación *in situ* de conjugados entre polímeros y proteínas. A partir de esto Wenguo Zhao presenta una nanomedicina que responde a la glucosa a través de nanogeles poliméricos de GOX para modular la producción de H_2O_2 por terapia de

restricción energética y de oxidación en un tipo de cáncer como el melanoma, para lo cual, como se observa en la figura 9, GOX reacciona con un polímero funcionalizado con aldehído para formar nanogeles poliméricos de GOX a través de imina o bases de Schiff haciendo reaccionar los grupos amino de GOX y los grupos aldehído del polímero. GOX es una proteína dimérica con once grupos amino libres por monómeros, lo que proporciona suficientes grupos amino para la formación de múltiples enlaces de imina entre GOX y el polímero funcionalizado con aldehído para la formación del nanogel. Los nanogeles poliméricos de GOX no solo mostraron una retención de la actividad enzimática, sino que también mejoraron la estabilidad respecto a GOX nativo, y más importante aún, mostraron una retención en los tumores de 88 veces mayor que GOX libre después de la inyección intratumoral. Como resultado, los nanogeles poliméricos de GOX no solo muestran una alta eficacia contra el melanoma, sino que además no tienen toxicidad sistémica; mientras que GOX libre en la misma dosis es ineficaz en la terapia contra el melanoma y posee una alta toxicidad sistémica. (13)

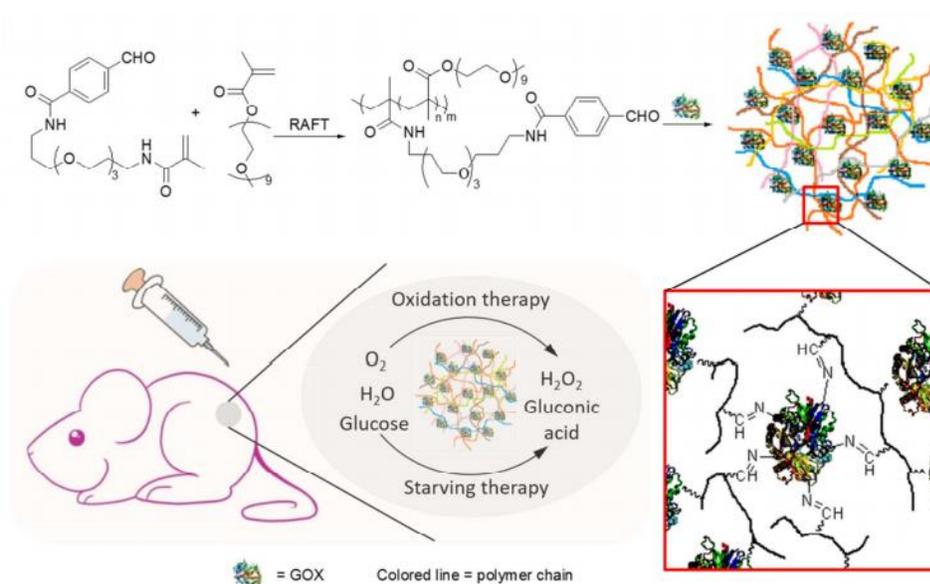


FIGURA 9: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA SINTESIS DE NANOGELES GOX-poly(FMBA-co.OEGMA) PARA LA TERAPIA SINÉRGICA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA Y OXIDACIÓN.,Obtenido de Lian-Hua Fu, et al. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cáncer diagnosis and treatment. Chem. Soc. Rev 2018 vol 47 (17) (14)

4.2.2 ROL DE LA NANOTECNOLOGÍA ACOPLADA A GOX

La nanotecnología es un campo de investigación conocido desde el siglo pasado. Desde que "nanotechnology" fue presentado por el premio Nobel Richard P. Feynman durante su famosa conferencia de 1959 " *Hay mucho espacio en la parte inferior* " se han realizado varios desarrollos revolucionarios en el campo de la nanotecnología. La nanotecnología produce materiales de varios tipos a nivel de nanoescala. Las nanopartículas (NP) son una amplia clase de materiales que incluyen sustancias particuladas, que tienen una dimensión de menos de 100 nm. Las NP no son moléculas simples en sí mismas y, por lo tanto, están compuestas por tres capas, es decir la capa superficial, que puede estar formada con una variedad de moléculas pequeñas, iones metálicos, surfactantes y polímeros. La capa de cubierta, que es un material químicamente diferente del núcleo en todos los aspectos, y el núcleo, que es esencialmente la parte central del NP y generalmente se refiere al propio NP.

(42) Las nanopartículas se pueden clasificar de muchas maneras, de acuerdo con su tamaño, forma y propiedades del material. Algunas clasificaciones distinguen entre nanopartículas orgánicas e inorgánicas; el primer grupo incluye dendrímeros, liposomas y nanopartículas poliméricas, mientras que el último incluye fullerenos, puntos cuánticos y nanopartículas de oro. Otras clasificaciones dividen las nanopartículas en función de si están basadas en carbono, cerámica, semiconductores o polímeros. Hay tres propiedades físicas principales de las nanopartículas, y todas están interrelacionadas: (1) son altamente móviles en estado libre (por ejemplo, en ausencia de alguna otra influencia adicional, una nanoesfera de sílice de diámetro 10 nm tiene una velocidad de sedimentación por gravedad de 0,01 mm/día en agua); (2) tienen enormes superficies específicas (p.Ej., Una cucharadita estándar, o aproximadamente 6 ml, de nanoesferas de sílice de 10 nm de diámetro tiene más superficie que una docena de canchas de tenis de tamaño doble; el 20% de todos los átomos en cada una la nanosfera se ubicará en la superficie); y (3) pueden exhibir lo que se conoce como efectos cuánticos. Así, las nanopartículas tienen una amplia gama de composiciones, dependiendo del uso o del producto. (43)

La nanotecnología ha cambiado el panorama de la biomedicina, en particular, los sistemas de administración de fármacos basados en las nanopartículas, han recibido un gran reconocimiento para la terapia tumoral debido a la mejora de las propiedades físico-

químicas que le otorga a los medicamentos tradicionales y la preferencial acumulación de estos en tumores a través del efecto mejorado de penetración y retención. Sin embargo, la mayoría de las nano-drogas transportadoras aún se enfrentan a muchos problemas, como interacciones no específicas con sus entornos, la fuga prematura de drogas y la falta de orientación activa al lugar de enfoque, lo que lleva a una menor biodisponibilidad, así como a algunas reacciones adversas graves. Aunque la construcción de nanopartículas administradoras de fármacos sensibles a estímulos podría aumentar la especificidad al tumor, aun es difícil realizar un administrador eficiente en la interfaz y la liberación del fármaco controlada de forma precisa debido a la personalizada diversidad, la heterogeneidad de los tumores, la complejidad del microambiente tumoral y la inestabilidad. (47) Según Xiao Du en un estudio de 2018, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN), han sido demostrados como uno de los portadores de drogas más prometedores, debido a su tamaño de poro uniforme, gran área de superficie, grandes volúmenes de poros, alta capacidad de carga de fármaco, notable biocompatibilidad y fácil funcionalización de la superficie, es por esto su empleo para entrega tanto de GOX como agentes quimioterapéuticos puede ser una elección atractiva, sin embargo, los MSN tradicionales carecen de funcionalidad para atacar directamente al cáncer, lo que puede causar graves efectos fuera del objetivo y llevar a reacciones secundarias obvias, por lo tanto la introducción de ligandos de orientación activa o anticuerpos para el sistema resulta urgente, es aquí donde el ácido hialurónico juega un papel fundamental, siendo un polisacárido aniónico lineal ha recibido gran atención por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no inmunogenicidad, especialmente por su alta afinidad al receptor de CD44; nanotransportadores modificados con ácido hialurónico son capaces de lograr simultáneamente la orientación pasiva a tumores sólidos, a través del efecto mejorado de permeación y retención, y el direccionamiento activo a través de endocitosis mediada por CD44 sin ligandos de direccionamiento adicionales. Así en el estudio se genera una plataforma para la combinación de quimioterapia con terapia de restricción energética como combate contra el cáncer. En la figura número 10 se observa primero los procesos de preparación de las nanopartículas MSNs-GOX/PLL/HA, luego se puede ver el suministro de las nanopartículas con la enzima GOX como fármaco incluyendo los pasos de la inyección intravenosa y el efecto de permeabilidad y retención mejorada, además se puede observar en la imagen, el proceso

celular que contiene la internalización mediada por CD44, la degradación de ácido hialurónico por la hialuronidasa, junto con la exposición de Poly L-lisina en el medio tumoral rico en hialuronidasa, el escape lisosomal o endosomal para la liberación citoplásmica de GOX y del medicamento contra el cáncer Paclitaxel y finalmente se puede ver la reacción de GOX intracelular con glucosa. (48)

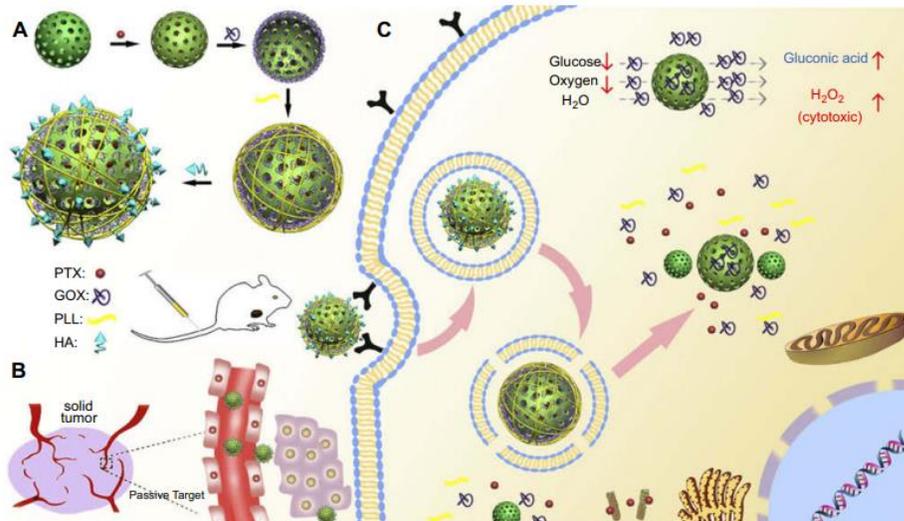


FIGURA 10: ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE NANOPARTICULAS DE MSNs-GO_x/PLL/HA PARA LA TERAPIA SINÉRGICA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA Y QUIMIOTERAPIA. Obtenido en Xiao Du, et al. Glucose-responsive mesoporous silica nanoparticles to generation of hydrogen peroxide for synergistic cancer starvation and chemotherapy therapy. International Journal of Nanomedicine 2019. Vol 14. (48)

En otra investigación realizada por Yao-Hui Zhang, et al, combinan dióxido de manganeso (MnO₂) con la enzima glucosa oxidasa para la terapia de restricción energética contra el cáncer, donde MnO₂ podría eliminar los productos de la oxidación de la glucosa como el ácido y el H₂O₂ para producir O₂, esta combinación podría aliviar el efecto secundario causado por el aumento de H₂O₂, acidez e hipoxia, para lo que se diseña un nanosistema tipo ciclo agotador de glucosa, para elevar la eficacia de la terapia de restricción energética contra el cáncer. Como se muestra en la figura 11 las partículas de MnO₂ se cubren con GOX y luego con un polímero de ácido hialurónico, ambos mediante atracción electrostática, gracias a esto el nanosistema podría apuntar a células cancerosas que expresan en exceso CD44. La enzima glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa

en ácido glucónico y H_2O_2 mediante la utilización de oxígeno, mientras tanto MnO_2 reacciona con los productos para generar oxígeno. Este nanosistema no sólo puede lograr un consumo efectivo de la glucosa sino que también aliviar la hipoxia y reducir la expresión de GLUT 1 para inhibir el metabolismo, que aumenta la agresividad y fomenta la metástasis. (15)

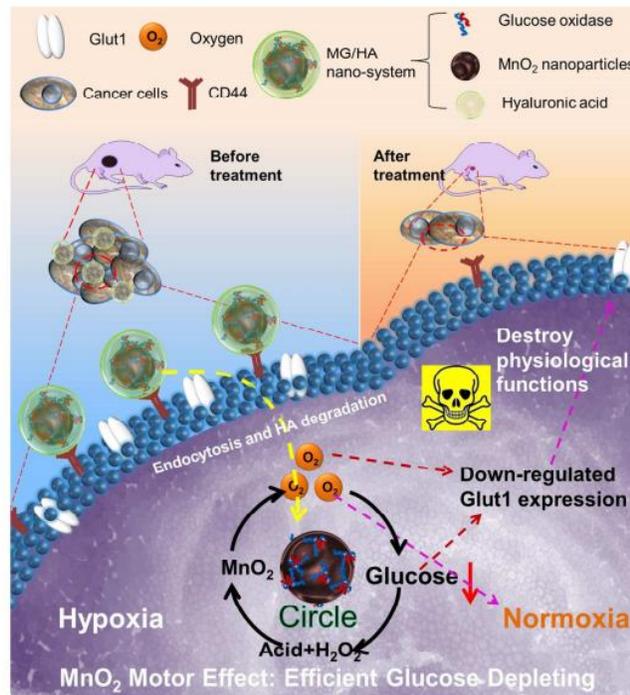


FIGURA 11: ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DEL NANOSISTEMA MG/HA CON EL EFECTO DE MnO_2 CON UNA EXPRESIÓN INTERFERIDA DE GLUT 1 PARA INICIAR LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER. Obtenido de Yao-Hui Zhang, et al. *MnO₂ Motor: A Prospective Cancer Starving Therapy Promoter*. ACS Applied Materials & Interfaces 2018 vol 10 (17). (15)

En un estudio realizado por Hadi Ranji-Burachaloo en 2019, se utiliza la enzima GOX en una terapia combinada junto con hemoglobina basada en el ataque de las células cancerosas a partir de la reacción de Fenton y la terapia de restricción energética que otorgaría cada una. Tanto terapia por reacción de Fenton como la de restricción energética han sido ampliamente estudiadas, la terapia a partir de Fenton se basa en la administración de hierro (Fe^{+2} y Fe^{+3}) en las células cancerosas, los cuales reaccionarían con las altas

concentraciones de peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilos reactivos ($\text{OH}\cdot$) estos radicales no difunden, sino que en su lugar de generación, produce la oxidación de proteínas, lípidos y/o ADN, el problema radica en que las partículas productoras de estos radicales poseen muy baja estabilidad, escasa selectividad y una alta agresividad. A pesar de esto, se ha reportado que una combinación de la terapia de Fenton junto con la de restricción energética podrían tener mejores resultados para el combate de células cancerosas. Para esto se realiza un marco de imidazolato zeolítico sensible a pH 8 (ZIF-8) que contiene GOX y hemoglobina como reactor de fenton natural, la encapsulación se realiza a través de un procedimiento de co-precipitación. La nanopartícula es estable a pH 7,4, mientras que a pH más bajo se activa generando altos niveles de $\text{OH}\cdot$. En la figura 12 se observa el nanosistema que contiene GOX y hemoglobina, donde en una primera instancia se encuentra estable. Al someterse a un pH ácido este comienza a desintegrarse liberando la Glucosa Oxidasa y la hemoglobina. La primera va a realizar la catálisis consumiendo glucosa y oxígeno y liberando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, este último será utilizado por el hierro entregado por la hemoglobina generando radicales hidroxilos los cuales serán tóxicos para las células cancerosas, mientras que el ácido glucónico acidificará aún más el pH generando un feedback positivo e incrementando aún más las reacciones anteriores. (11)

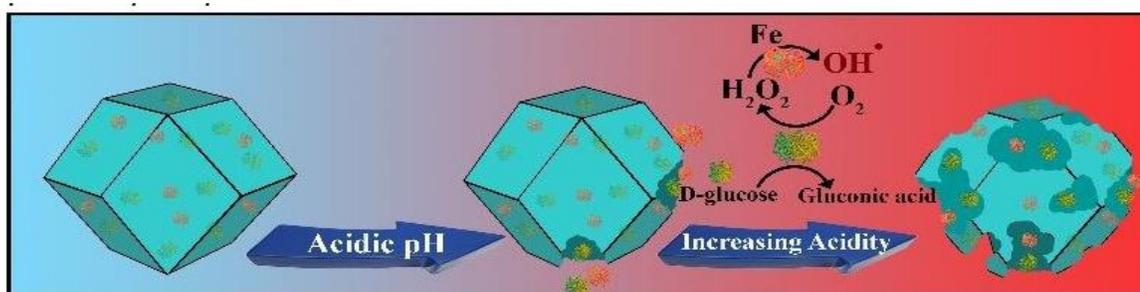


FIGURA 12: ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE EL CONTROL REALIZADO POR LA HEMOGLOBINA Y GOX EN LA GENERACIÓN DE RADICAL HIDROXILO Y PH ÁCIDO. Obtenido de Hadi Ranji-Burachaloo, et al. Combined Fenton and Starvation Therapies using Hemoglobin and Glucose Oxidase. Royal Society of Chemistry. 2019. (11)

Por otro lado, Jiong Li establece que los nanodispositivos poliméricos sensibles (RPND) que son sensibles a los estímulos externos o internos, tienen un gran potencial en diversos campos, como el diagnóstico, la adherencia adaptada a la superficie, forma adaptada a la

memoria, purificación de agua, purificación, ingeniería de tejidos y drogas. En el tratamiento del cáncer los RPNDs pueden transportar drogas a los sitios objetivos para ejercer efectos terapéuticos y reducir efectos secundarios adversos a través de una forma de liberación de drogas a demanda, por ejemplo portadores para la administración de doxorubicina sensible al campo térmico o magnético, han sido aprobados por la FDA para realizar ensayos clínicos, ya que estos estímulos externos pueden ser regulados con mayor precisión que los internos. Sin embargo, existen algunos obstáculos incluyendo la penetración limitada al tejido por algunos estímulos externos, escasa selectividad para controlar la liberación del fármaco en el sitio del tumor sobre los tejidos circundantes y la adaptación entre las máquinas externas que proporcionan los estímulos y los portadores sensibles de la droga en el sitio del tumor. Comparados con los estímulos extrínsecos, RPNDs sensibles a estímulos intrínsecos serán más factibles ya que las drogas encapsuladas se liberarán espontáneamente en presencia de microambiente tumoral como pH más bajo, mayor concentración de glutatión, especies reactivas de oxígeno aumento del nivel de algunos biomarcadores. Como componente principal de ROS, H_2O_2 juega un rol fundamental en la fisiología de regulación, y su sobreproducción está estrechamente relacionada con muchas enfermedades, incluida la carcinogénesis, por lo tanto H_2O_2 puede servir como estímulo asociado al cáncer para la liberación controlada de la droga, sin embargo la heterogeneidad de las células cancerosas y el entorno dinámico del microambiente tumoral en diferentes etapas de la enfermedad otorga una variación de estímulos de H_2O_2 , lo que afectará la eficiencia y selectividad de la liberación del fármaco en el sitio del tumor. La Glucosa Oxidasa para amplificar el H_2O_2 en las células tumorales podría mejorar enormemente la eficacia terapéutica de RPND sensibles a H_2O_2 , además de causar daño oxidativo a las células cancerígenas, además el agotamiento concomitante de la glucosa bloquea el suministro de nutrientes lo que podría contribuir al cáncer. El único problema sería el agravamiento de la hipoxia en el microambiente tumoral lo que es responsable de mal pronóstico y fracaso terapéutico en muchos casos. Afortunadamente profarmacos bioreductores pueden ser convertidos desde una forma no toxica a citotóxica bajo la hipoxia del microambiente tumoral. En la figura 13 se observa el desarrollo de nanodispositivos poliméricos sensibles (RPNDs) específicos para un tumor, con el fin de generar H_2O_2 en feedback positivo denominados PAG, que liberan fármacos a través de una cascada amplificada para una terapia sinérgica contra el cáncer. Primero se sintetiza el

copolímero tribloque ABA compuesto por poli etilenglicol (PEG) y policaprolactona (PCL) con esteres de peroxalato (PO) como enlace sensible al peróxido de hidrógeno, el cual, podría ensamblarse a vesículas de nanoescala para cargar simultáneamente GOX y el profarmaco activado por hipoxia (AQ4N) en la cavidad hidrófila donde la estructura estructural vesicular evitaría la fuga de ambos en el sistema circulatorio. Luego de la acumulación del sistema en el tumor, los segmentos de PO podrían ser escindidos por el alto nivel de H_2O_2 lo que daría la permeabilidad a la membrana de PAG para la entrada de glucosa, gracias a esto GOX catalizaría la reacción de la glucosa produciendo H_2O_2 masivo, acompañado de un agotamiento concomitante de los nutrientes. El H_2O_2 producido no solo actuaría como terapia de oxidación, sino que también podría aportar al microentorno sirviendo de retroalimentación positiva para atacar segmentos de PO e inducir la destrucción de PAG para liberar AQ4N. Por otro lado el agotamiento de oxígeno dará lugar al aumento de la hipoxia del microentorno, lo que podría activar aún más la transformación de AQ4N a una forma citotóxica (AQ4) para la quimioterapia. (49).

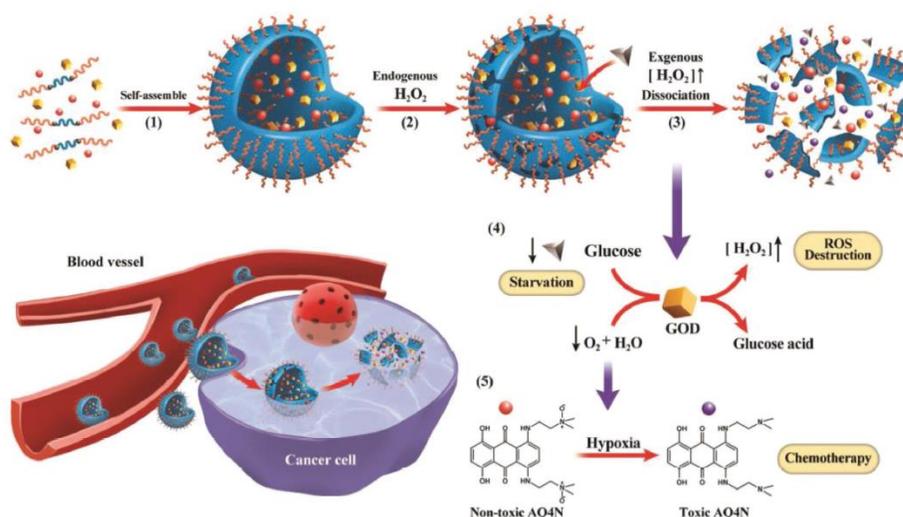


FIGURA 13: ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CONSTRUCCIÓN FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE DEPÓSITO Y MODIFICACIÓN EN CASCADA (PAG) PARA LA TERAPIA SINÉRGICA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA, CITOTOXICIDAD OXIDATIVA Y QUIMIOTERAPIA.. Obtenido de Jiong Li, et al. Programmable Therapeutic Nanodevices with Circular Amplification of H_2O_2 in the Tumor Microenvironment for Synergistic Cancer Therapy. *Advanced Healthcare Material*. 2019 (49)

Dentro de las técnicas para combinar la quimioterapia contra el cáncer con la glucosa oxidasa, existe un nanosistema creado Hong Cheng y otros investigadores en 2018 donde se desarrolla un nanoreactor biomimético en cascada denominado Mem@GOx@ZIF-8@BDOX que activaría quimioterapia a través de la restricción energética mediada por GOX. Para esto primero se recolectó una membrana celular de carcinoma murino (4T1 cell) para dotar la superficie de las nanopartículas de capacidad de orientación homóloga y evitar el ataque inmune del organismo, además se recolecta la enzima glucosa oxidasa y se inmoviliza para el consumo de glucosa intracelular y así cortar los suministros y generar el metabolismo de restricción energética en el microambiente tumoral, luego se utiliza un marco de imidazolato zeolítico poroso desintegrado (ZIF-8), para inyectar el profarmaco sensible a las concentraciones de H_2O_2 doxorubicina (BDOX) y generar su liberación controlada. Gracias a lo anterior el ácido generado por la reacción de GOX, además del H_2O_2 harían desencadenar la liberación de BDOX para amplificar la quimioterapia. Es decir, el nanoreactor en cascada biomimético podría lograr una terapia de restricción energética y una quimioterapia amplificada específica para el tumor por la integración de fármacos a través de una administración dirigida, el ajuste del microentorno tumoral, así como la liberación y activación de profarmacos controlada. En la figura número 14 se observa primero la preparación del nanosistema, además se puede ver como las proteínas de membrana de la nanopartícula son homologas a las de las células tumorales, realizándose una absorción inmune del nanosistema, una vez dentro de la célula tumoral, la enzima GOX cataliza la reacción consumiendo glucosa y generando peróxido de hidrógeno más ácido glucónico contribuyendo al ajuste del microambiente tumoral y a la terapia de restricción energética, gracias a esto hay una desintegración de nanosistema sensible a la acidez liberando el quimioterapéutico BDOX el cual es activado por las altas concentraciones de H_2O_2 . (47)

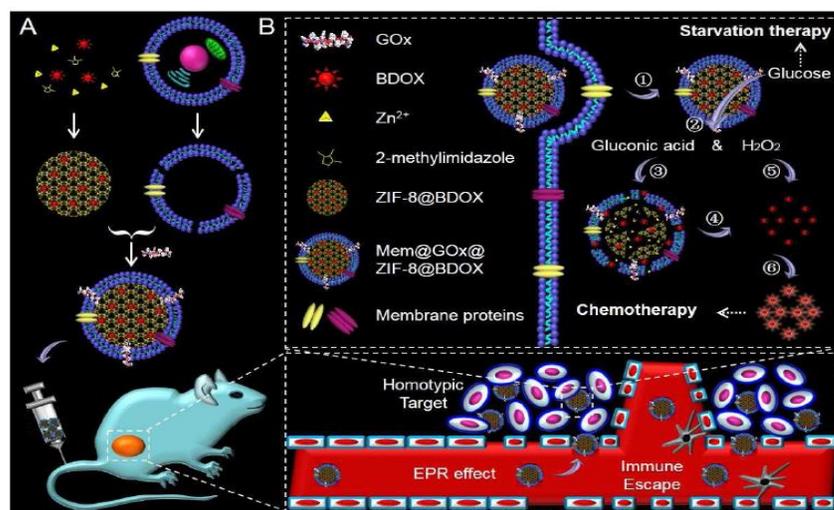


FIGURA 14: ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PROCESOS DE PERPARACIÓN Y MECANISMO DEL NANOACTOR BIOMIMÉTICO EN CASCADA (MEM/GOX/ZIF-8/BDOX) PARA LA TERAPIA EN CASCADA DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA Y QUIMIOTERAPIA AMPLIFICADA CONTRA EL TUMOR. Obtenido de Hong Cheng, et al. A biomimetic cascade nanoreactor for tumor targetedstarvation therapy-amplified chemotherapy Biomaterials. 2019. (47)

Es así como existen una gran variedad de investigaciones tanto experimentales como teóricas acerca del uso de la enzima Glucosa Oxidasa en diferentes terapias contra el cáncer, ya sea de forma individual, o acompañada de algún otro tipo de tratamiento en estudio o ya conocido, ya sea para aumentar la efectividad de la muerte de las células cancerígenas como para evitar los efectos secundarios que estos podrían traer al organismo. En la tabla 3 se resumen las terapias revisadas en esta investigación.

Tabla 3: USO DE ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER Y SUS RESPECTIVAS INMOVILIZACIONES.

Uso	Terapia	Material de inmovilización	de Formación de inmovilizador	Referencia
Monoterapia	Terapia de oxidación por generación de oxígeno singlete.	Hidrogel	Formación de hidrogel in situ por reticulación de Nap-FFK Furoyl y (GCF) para encapsulación de GOX y CPO.	(34)
	Terapia de restricción energética y modulación de producción de H ₂ O ₂	Hidrogel GOX-PMDA	Polímero de poli(N, N'-dimetilamino-2-etilmetacrilato) polimerizado por radicales de	(30)

				transferencia atómica (ATPR) al extremo N-terminal de GOX.	
	Terapia de restricción energética	Vesículas de ácido trímico.		Trifusión de ácido trímico con biotina y el resto lineal de polietilenglicol (PEG) con posterior encapsulación de GOX.	(35)
	Terapia de restricción energética y de oxidación.	Nanogeles poly(FMBA-co.OEGMA)	GOX-	Reacción de los grupos amino de GOX y los grupos aldehído del polímero generando una base de Schiff.	(12)
	Terapia de restricción energética con control de los productos de GOX por MnO ₂ .	Nanosistemas de MG/HA	de	MnO ₂ se cubren con GOX y luego con un polímero de ácido hialurónico, mediante atracción electrostática	(15)
Sinérgica	Terapia sinérgica de restricción energética y quimioterapia.	Nanopartícula de sílice mesoporosa (MSN) MSNs-GOX/PLL/HA		Síntesis de nanopartícula de sílice mesopora multifuncional recubierta con poli L-lisina (PLL) y ácido hialurónico (HA) envuelven GOX y paclitaxel (PTX).	(39)
	Terapia de restricción energética y reacción de Fenton	Nanosistema de GOX y hemoglobina	y	Síntesis de marco de imidazolato zeolítico sensible a pH 8 (ZIF-8) con GOX y hemoglobina, encapsulado por co-precipitación.	(11)
	Terapia sinérgica de restricción energética, oxidativa y quimioterapia.	Nanodispositivos poliméricos sensibles a estímulos (RPNDS)	a	Síntesis de copolímero tribloque ABA compuesto por poli etilenglicol (PEG) y policaprolactona (PCL) con esteres de peroxalato (PO) como enlace sensible al peróxido de hidrógeno, ensamblado a vesículas de nanoescala con carga simultánea de GOX y el profarmaco activado por hipoxia (AQ4N)	(40)
	Terapia en cascada de restricción energética y quimioterapia.	Nanoreactor biomimético Mem@GOx@ZIF-8@BDOX.		Recolección de membrana celular de carcinoma murino (4T1 cell) envueltas en un marco de imidazolato zeolítico poroso desintegrado (ZIF-8) junto con el fármaco doxorubicina (BDOX).	(38)

5. CONCLUSIONES

La terapia contra el cáncer ha sido la base de muchas investigaciones a lo largo de los años debido a la complejidad de la enfermedad, la heterogeneidad de la misma, la morbilidad y mortalidad que involucra y los problemas que le llevan a los pacientes las terapias ya existentes. Es por esto que se buscan alternativas que impliquen terapias menos invasivas, más eficaces y más simples de implementar. Es en esta búsqueda donde se encuentra la enzima Glucosa Oxidasa, la cual, mediante la catálisis de la reacción que consiste en el consumo de oxígeno y glucosa, con la consiguiente producción de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, se apunta como un posible tratamiento para eliminar células tumorales induciendo la apoptosis. Esta reacción otorgaría variadas opciones de terapias, entre ellas se encuentran la terapia de restricción energética, que consiste en privar a las células tumorales de metabolitos necesarios para su proliferación, lo que se lograría gracias al consumo de la glucosa, que es el principal nutriente de las células cancerosas, otra alternativa es la terapia de hipoxia, donde gracias al consumo de oxígeno se puede inducir la muerte celular, además de inducir la liberación de fármacos que necesiten un ambiente hipóxico para actuar. Por otro lado, los productos de la catálisis también ayudarían, dentro de estos está peróxido de hidrógeno, el cual, tanto por si solo, como por aumentar la cantidad de radicales libres, podría realizar una terapia de oxidación, eliminando las células tumorales a través del estrés oxidativo, el que podría consecuentemente activar la apoptosis. Finalmente el ácido gluconico generado aumenta la acidez del entorno, promoviendo la liberación de fármacos sensibles al pH ácido y evitando así que estos se liberen en todo el organismo disminuyendo los efectos secundarios que estos podrían traer.

El problema del uso de la enzima radica en su forma de administración, ya que al utilizar la glucosa oxidasa de forma libre, se podría disminuir de manera significativa su actividad catalítica debido a las condiciones presentes en el organismo y además genera una

alta toxicidad, ya que los metabolitos necesarios para la catálisis se encuentran en la mayoría de las células presente en el cuerpo, generando productos tóxicos prácticamente en todo el organismo y no solo eliminando las células tumorales. Es por lo anterior que se busca inmovilizarla y administrarla de tal forma que su actividad no se vea alterada y se limite en el microambiente tumoral sin moverse hacia las células normales, en busca de ello los investigadores han postulado diferentes medios, ya sean hidrogeles que encapsulen a la enzima y la liberen de forma específica, o nanopartículas que sean capaces de administrarla sin afectar su función. La ventaja de los materiales inmovilizadores anteriormente desarrollados, es que son inocuos en el organismo, pueden ser manipulados para liberar la enzima ya sea recibiendo estímulos del medio o gracias a los componentes que se le agreguen al sistema, resulta más fácil administrarlos y presentan mayores ventajas en cuanto a la especificidad de la terapia debido a que la misma manipulación podría hacer que se dirijan específicamente al microambiente tumoral, además entregan la posibilidad de introducir la enzima en el cuerpo acompañada de otro fármaco terapéutico ya conocido ampliando así el efecto del mismo o bien, evitando la producción de mayores efectos secundarios en los individuos. Aún queda evaluar el material más apropiado para la terapia, que equilibre la conservación de la actividad enzimática junto con la inocuidad para los individuos, por lo tanto una posible visión a futuro sería realizar una comparación detallada de que material es el más adecuado y cuáles serían las terapias que se combinen con la enzima para obtener un resultado más favorable en el combate del cáncer.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Salud INdl. Instituto Nacional del Cáncer. [Online]; 2015. Acceso 22 de abril de 2019. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
2. Society AC. American Cancer Society. [Online]; 2016. Acceso 22 de abril de 2019. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.
3. Salud OMDl. OMS. [Online]; 2018. Acceso 22 de abril de 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
4. Carlos BJ, Nicolas M, Eric D. Combatiendo el metabolismo de células cancerosas mediante la activación de SIRT3 y el ejercicio físico. *Revista Médica Chile*. 2018.
5. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biology*. 2017; 12.
6. Burns Jorge S MG. Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. *Revista internacional de ciencias moleculares*. 2017; 18(12).
7. Hermanson G. *Técnicas de Bioconjugado*. tercera edición ed.: AP; 2013.
8. Dinda Soumik SSKDP. Glucose Oxidase Mediated Targeted Cancer-Starving Therapy by Biotinylated Self-Assembled Vesicle. Royal Society of Chemistry. 2018.
9. Sandip B. Bankar ea. Glucose oxidase — An overview. *ELSEVIER*. 2009; 27(4).
10. Chun Ming Wong ea. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008; 78(6).
11. Hadi Ranji-Burachaloom ea. Combined Fenton and Starvation Therapies using Hemoglobin and Glucose Oxidase. Royal Society of Chemistry. 2019.
12. Fu LH. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. Royal Society of Chemistry. 2018; 47(17).
13. Wenguo Zhao ea. Glucose Oxidase-Polymer Nanogels for Synergistic Cancer Starving

- and Oxidation Therapy. American Chemical Society. 2017; 9(28).
14. Lian-Hua Fu ea. Glucose Oxidase-Instructed Multimodal Synergistic Cancer Therapy. *Advanced science news*. 2019.
 15. Yao-Hui Zhang ea. MnO₂ Motor: A Prospective Cancer Starving Therapy Promoter. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2018; 10(17).
 16. Fothergill-Gilmore. Evolution of Glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1993; 59(2).
 17. Oscar MC. Glicolisis, Efecto Warburg y Flexibilidad Metabólica Tumoral. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. 2015.
 18. Hany A Omar ea. Energy restriction: stepping stones towards cancer therapy. *Future Oncology*. 2012; 8(12).
 19. Zhigang Yao ea. Promoting Oxidative Stress in Cancer Starvation Therapy by Site-Specific Startup of Hyaluronic Acid-Enveloped Dual-Catalytic Nanoreactors. *Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces*. 2019.
 20. Paul Ray ea. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and redox regulation in cell signaling. Author Manuscript. 2012; 24(5).
 21. Mitochondria osacd. Martin Ott, et al. Springer. 2007; 12(5).
 22. Muz Barbara ea. The Role of Hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015.
 23. Baran Natalia ea. Molecular Pathways: Hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2017; 23(10).
 24. Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *The Lancet Oncology*. 2000; 1(1).
 25. Yulia Vugmeyster ea. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*. 2012; 3(4).
 26. Qun Liu ea. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification–internal gelation–adsorption–polyelectrolyte coating method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007.
 27. Vellard M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Elsevier. 2003; 14(4).

28. Manish K. Dubey ea. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates. *Frontiers in microbiology*. 2017; 8.
29. Michael Zamuzuk ea. Preclinical Safety Studies of Glucose Oxidase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993; 266(3).
30. Hanjun Hao ea. In Situ Growth of a Cationic Polymer from the N-Terminus of Glucose Oxidase to Regulate H₂O₂ Generation for Cancer Starvation and H₂O₂ Therapy. *Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces*. 2019.
31. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: a review. *Journal of Advanced Research*. 2015; 6(2).
32. Vardar G. Synthesis of glucose oxidase-PEG aldehyde conjugates and improvement of enzymatic stability. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology an International Journal*. 2017; 46(4).
33. Camron S. Dawes HKaCCL. Enzyme-immobilized hydrogels to create hypoxia for in vitro cancer cell culture. *Journal of Biotechnology*. 2017.
34. Qingcong Wei ea. Injectable Peptide Hydrogel Enables Integrated Tandem Enzymes' Superactivity for Cancer Therapy. *iScience*. 2019.
35. Soumik Dinda ea. Glucose Oxidase Mediated Targeted Cancer-Starving Therapy by Biotinylated Self-Assembled Vesicle. *Royal Society of Chemistry*. 2018.
36. Ibrahim Khan ea. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal Chemistry*. 2017.
37. Peter Dobson ea. *Encyclopedia Britannica*. [Online]; 2019. Acceso 30 de Juniode 2019. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle#ref288108>.
38. Hong Cheng ea. A biomimetic cascade nanoreactor for tumor targeted starvation therapy-amplified chemotherapy. *Biomaterials*. 2019; 195.
39. Xiao Du ea. Glucose-responsive mesoporous silica nanoparticles to generation of hydrogen peroxide for synergistic cancer starvation and chemotherapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2019; 14.
40. Jiong Li ea. Programmable Therapeutic Nanodevices with Circular Amplification of H₂O₂ in the Tumor Microenvironment for Synergistic Cancer Therapy. *Advanced sciences news*. 2019; 8(10).

41. Morteza Bahram ea. Una introducción a los hidrogeles y algunas aplicaciones recientes. IntechOpen. 2016.
42. Brahmeshwar Mishra ea. Hydrogels: An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering. Austin Journal of Biomedical Engineering. 2017.
43. Caló Enrica ea. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. European Polymer Journal. 2015; 65.
44. Qinyuan Chai ea. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. MDPI. 2017; 3(1).
45. Li J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. HHS Author Manuscripts. 2016; 1.
46. Radhika Narayanaswamy ea. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. MDPI. 2019; 24(3).
47. Nasimi Parva ea. Medical Use of Nanoparticles: Drug Delivery and Diagnosis Diseases. International Journal of Green Nanotechnology. 2013; 1.
48. Anna Pratima Nikalje ea. Nanotechnology and its Applications in Medicine. Medicinal Chemistry. 2015; 5(2).
49. Jayanta Kumar Patra ea. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology. 2018; 16(71).