

# EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE HIERRO CONTENIDO EN NANOPARTÍCULAS

Janeth A. Valadez Rodríguez<sup>1</sup>, Flor Y. Flores Hernández<sup>1</sup>, Eristeo García Márquez<sup>2</sup>. Sara E. Herrera Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C., Avenida Normalistas 800, Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup>Autopista Mty-Aeropuerto, Vía de la Innovación 404, Parque PIIT, 66628 Cd Apodaca, N.L.  
sherrera@ciatej.mx

## RESUMEN.

El hierro es fundamental en el transporte de oxígeno a través de la hemoglobina. La deficiencia ocasiona anemia ferropénica. La deficiencia de hierro afecta a 30% de personas en el mundo. A pesar de diversas campañas implementadas en México, los progresos han sido insuficientes. Además de factores como la oxidación, efectos indeseables de color y sabor, la presencia de algunos componentes de la dieta reducen la capacidad de absorción de hierro (fitatos, polifenoles,  $\text{Ca}^{+2}$ ). Una forma de aumentar la biodisponibilidad del hierro es empleando hierro encapsulado en nanopartículas. En el presente trabajo se evaluó la viabilidad sobre células Caco-2 por efecto de la concentración de hierro contenido en nanopartículas. Se observó que las Fe-nanopartículas no generaron citotoxicidad en comparación con la sal de sulfato ferroso.

Palabras clave: hierro, anemia ferropénica, sulfato ferroso, nanopartículas.

## ABSTRACT.

Iron is fundamental in the transport of oxygen through hemoglobin. Iron deficiency causes anemia, a condition that affects around 30% of people on the wide world. Despite all the strategies implemented to avoid anemia, progress has been insufficient. In addition to factors such as oxidation, undesirable effects of color and taste, some dietary factors compounds reduce the iron absorption capacity such as phytates, polyphenols,  $\text{Ca}^{+2}$ . One way to increase bioavailability is using iron contained in nanoparticles. In this work, the viability of Caco-2 cells was evaluated under the effect of the concentration of iron contained in nanoparticles. It was observed that the Fe-nanoparticles did not generate cytotoxicity compared to ferrous sulfate salt.

Key words: iron, ferropenic anemia, ferrous sulfate, nanoparticles.

## I. INTRODUCCIÓN

El hierro es fundamental en diversas actividades biológicas, por ejemplo, síntesis de ADN, cofactor de diversas enzimas (catalasas y peroxidases), respuesta inmune, transporte de oxígeno a través de la hemoglobina, entre otras (Madrazo et al., 2010). La deficiencia de hierro es considerada por la Organización Mundial de la Salud, como el principal desorden nutricional a nivel mundial, afecta a 30% de la población mundial (De Benoist et al., 2008; Organización Mundial de la Salud, 2018). Pero, la administración de hierro es difícil, porque los compuestos solubles como el sulfato ferroso se absorben, sin embargo, causan cambios inaceptables de color y sabor en los alimentos. Mientras que,

los compuestos insolubles, causan pocos cambios sensoriales en alimentos, pero no se absorben (Hosny et al., 2015). Por otra parte, se han desarrollado diversas campañas de prevención y tratamiento de la anemia ferropénica, basadas principalmente en la suplementación con sales ferrosas o férricas. El sulfato ferroso debido a accesibilidad económica ha sido el más usado (Hurrell, 2002). Sin embargo, los progresos han sido insuficientes, diversos factores influyen e inhiben la absorción de hierro, como los componentes ubicuos en vegetales como el té y café (polifenoles, fitatos) y exceso de minerales como el calcio (Hallberg L., 1987; Zijp et al., 2000), aunado a efectos secundarios como irritación intestinal, diarrea, náusea, estreñimiento, fiebre, entre otros malestares (Hurrell, 2002; Martínez-Salgado et al., 2008; Hosny et al., 2015; Zariwala et al., 2013). Diversos reportes han mencionado que la síntesis de nanopartículas cargadas con hierro puede resolver las desventajas mencionadas. Las nanopartículas potencian la absorción de sustancias lipofílicas e hidrofílicas. Mejoran la solubilidad, mayor entrega de micronutrientes y principios activos, transporte y absorción debido a incremento de área superficial de contacto (Hosny et al., 2015; Zariwala et al., 2013; Shukla et al., 2017), reducen la oxidación, evitan el paso por el hígado, potencia la distribución y biodisponibilidad, evita la disociación y mejora la actividad biológica. Sin embargo, no se conoce el efecto citotóxico de nanopartículas que contienen hierro. No existen suficientes datos sobre su efecto en viabilidad celular y que proporcionen un panorama significativo del efecto de nanopartículas con hierro.

El presente estudio muestra el análisis de viabilidad celular en función de la concentración de hierro útil en nanopartículas usando células Caco-2 como modelo de células epiteliales humanas, en comparación con el sulfato ferroso.

## 2. Materiales y Métodos

La viabilidad celular fue evaluada usando la línea celular Caco-2 (ATCC HTB-37, ATCC) en medio esencial Eagle (EMEM; Sigma México, S.A.) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina), cultivándose 10,000 células por pozo. Se evaluó la nanopartícula de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) contenida en la nano partícula de quitosano-proteína de suero-hierro (NpB), a concentraciones 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{M}$  (con base al peso molecular del  $\text{FeSO}_4$ ). Las células fueron incubadas con las nano partículas a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  del 5% durante 24 y 48 horas. El control de referencia fue  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  solo a las mismas concentraciones que NpB. Se evaluó viabilidad celular cuantificando la actividad metabólica celular mediante la reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y cuantificando por colorimetría a 570 nm.

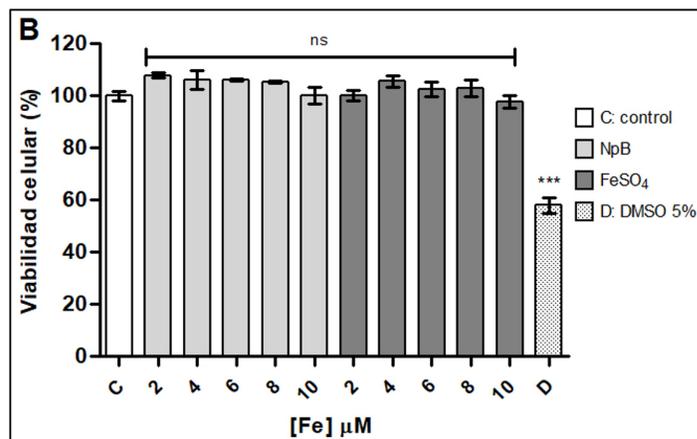
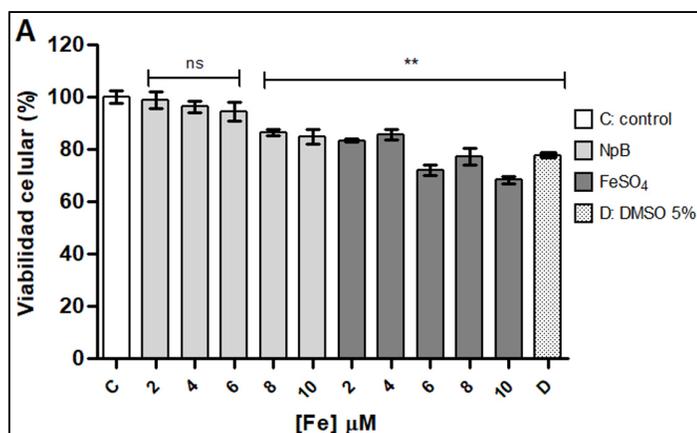
Se emplearon controles de citotoxicidad negativo y positivo, células sin tratamiento y células tratadas con DMSO 5% (dimetil sulfoxido), respectivamente. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para determinar diferencias estadísticamente significativas, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía y pruebas de comparación de medias por Dunnet y Tuckey ( $\alpha=0.05$ ) usando el software GraphPad Prism 5.

### 3. Resultados y Discusión

Se observó que NpB presentó disminución de viabilidad celular estadísticamente significativa, con respecto al control negativo de citotoxicidad, a partir de 8  $\mu\text{M}$ . La viabilidad disminuyó 14%. Mientras que,  $\text{FeSO}_4$  disminuyó la viabilidad celular a partir de 2  $\mu\text{M}$ , con una disminución de viabilidad celular de 17%, a las 24 horas de cultivo (gráfica A). A mayor tiempo (48 h) de exposición no se observó diferencia significativa de viabilidad celular (gráfica B). El efecto citotóxico a las 24 horas y su recuperación a las 48 horas probablemente fue debido a disponibilidad de hierro de ambos compuestos. Los resultados concuerdan con Natoli y colaboradores (2009), ellos observaron fase aguda de exposición (2 horas) y tardía (24 horas) con  $\text{Fe(II)}$  a 15  $\mu\text{M}$ . Concluyen que, el efecto tóxico en células Caco-2, ocurre adaptación en función del tiempo. Mientras que, concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , el efecto tóxico aumenta conforme al tiempo de exposición. Los resultados del compuesto evaluado NpB indican que el efecto de las nanopartículas sobre las células es menos letal. Se observó mayor diferencia usando concentración de 6  $\mu\text{M}$  (22% mayor viabilidad celular con NpB respecto a  $\text{FeSO}_4$ ). Posiblemente porque la ionización de hierro es controlada en comparación con  $\text{FeSO}_4$  control. Se observó mayor citotoxicidad a las 24 h con el sulfato ferroso, posiblemente indica que, el hierro debe ser suministrado en forma de complejo y no en forma iónica.

**Gráficos A y B.** Efecto de viabilidad celular y citotoxicidad de células

Caco-2 en función de concentración de hierro contenido en NpB y  $\text{FeSO}_4$  durante 24 y 48 h de exposición. La viabilidad celular decrece a 80% usando  $\text{FeSO}_4$ , cuando la concentración de hierro es mayor a 6  $\mu\text{M}$ , Mientras que NpB no reduce la viabilidad celular a más de 85% en todas las concentraciones de hierro estudiadas.



El empleo de nanopartículas que contienen hierro tiene un efecto protector en la mucosa del intestino de ratas expuestas a agentes tóxicos (Wardani et al., 2018). El empleo de nanopartículas del conjugado quitosano-proteína-hierro posiblemente pueda ayudar a resolver la deficiencia de hierro y controlar la anemia. Nosotros mostramos que se requieren dosis mínimas para mantener la viabilidad celular y reducir efectos tóxicos. Presentamos una visión significativa del efecto de nanopartículas con hierro y posible exceso de dosis de hierro, que parece que no es necesario.

### 4. CONCLUSIONES

El efecto de las NpB sobre la viabilidad celular de Caco-2 no es citotóxica de acuerdo al estándar internacional 10993-5, los resultados puede ser una visión general que proporcione el inicio de mayores estudios y rediseñar las dosis de NpB. Especialmente, como alternativa que sirva para reducir los efectos secundarios del hierro durante el tratamiento para lograr la salud en personas anémicas.

### PERSPECTIVAS

La síntesis de nanopartículas de quitosano-proteína de suero- $\text{FeSO}_4$  no presentaron efecto tóxico en células Caco-2. Pensamos que debe plantearse estudios en modelos animales con anemia ferropénica y la posterior suplementación de las nanopartículas en humanos para observar el efecto anti-anémico.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al fondo de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales -2015-01-1470- por el financiamiento de este trabajo de investigación, así como el apoyo de la beca número 488438 de posgrado.

## REFERENCIAS

De Benoist, B., McLean, E., Egli, I., & Cogswell, M. (2008). Worldwide prevalence of anemia 1993-2005: WHO global database on anemia.

Hallberg, L. (1987). Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22(sup129), 73-79.

Hosny, K. M., Banjar, Z. M., Hariri, A. H., & Hassan, A. H. (2015). Solid lipid nanoparticles loaded with iron to overcome barriers for treatment of iron deficiency anemia. *Drug design, development and therapy*, 9, 313.

Hurrell, R. (2002). How to Ensure Adequate Iron Absorption from Iron-fortified Food. *Nutrition Reviews*. 60, S7-S15

Madrazo González, Z., García Barrasa, A., & Rafecas Renau, A. (2010). Anemia, hierro, transfusión y alternativas terapéuticas. Revisión desde una perspectiva quirúrgica. *Cirugía Española*, 88(6), 358-368.

Madrazo González, Z., García Barrasa, A., & Rafecas Renau, A. (2010). Anemia, hierro, transfusión y alternativas terapéuticas. Revisión desde una perspectiva quirúrgica. *Cirugía Española*, 88(6), 358-368.

Martínez-Salgado, H., Casanueva, E., Rivera-Dommarco, J., Viteri, F. E., & Bourgues-Rodríguez, H. (2008). La deficiencia de hierro y la anemia en niños mexicanos. Acciones para prevenirlas y corregirlas. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 65, 86-99.

Natoli, M., Felsani, A., Ferruzza, S., Sambuy, Y., Canali, R., & Scarino, M. L. (2009). Mechanisms of defence from Fe(II) toxicity in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*. 23(8), 1510-1515.

Organización Mundial de la Salud. (12 de Julio de 2018). Obtenido de <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/es/>

Shukla, A., Dasgupta, N., Ranjan, S., Singh, S., & Chidambaram, R. (2017). Nanotechnology towards prevention of anaemia and osteoporosis: from concept to market. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(5), 863-879.

Wardani, G., Eraiko, K., & Sudjarwo, S. A. (2018). Protective Activity of Chitosan Nanoparticle against Cadmium Chloride Induced Gastric Toxicity in Rat. *Journal of Young Pharmacists*, 10(3), 303.

Zijp, I. M., Korver, O., & Tijburg, L. B. (2000). Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(5), 371-398.

Zariwala, M. G., Elsaid, N., Jackson, T. L., López, F. C., Farnaud, S., Somavarapu, S., & Renshaw, D. (2013). A novel approach to oral iron delivery using ferrous sulphate loaded solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 456(2), 400-407.

