

Evaluación de la Toxicidad *in vitro* del Nanosistema MAO Propuesto como Vehículo para la Liberación Controlada de Fármaco MTX Contra Cáncer de Próstata.

J. A. Roacho Pérez¹, E. Ramón Gallegos¹, R. Uribe Hernández¹, C. Chapa Gonzalez², A. V. López Salazar², C. D. Ávila Valenzuela², P. E. García Casillas²

¹ Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, D.F., México.

² Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México.

Resumen— El grupo de trabajo se encuentra desarrollando el nanosistema MAO, propuesto como vehículo liberador de mitoxantrona (MTX), buscando aumentar la calidad de vida de pacientes con cáncer de próstata que reciben quimioterapia con dicho fármaco. En este trabajo se presentan los resultados de las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* realizadas al sistema. Las ventajas encontradas en el vehículo MAO son la carencia de citotoxicidad en las primeras 72 horas de exposición. El vehículo cargado con MTX es capaz de liberarlo ya que presenta toxicidad sobre las muestras expuestas (demostrando bioactividad). Se encontró una concentración letal media de aproximadamente 0.8% v/v de nanosistema en medio de cultivo. En cuanto a las desventajas se encontró que a concentraciones menores de 0.5% los nanosistemas con fármaco matan un porcentaje alto de células, pero las que sobreviven tienen capacidad de volver a proliferar. Otra desventaja es que el sistema MAO es genotóxico a concentraciones del 1% ya que produce ruptura de las cadenas de ADN. Sin embargo, debido a que se conocen las concentraciones en las cuales no ocurren estos inconvenientes se considera al vehículo MAO como funcional y viable para seguir en desarrollo y evaluación.

Palabras clave— Citotoxicidad, genotoxicidad, liberador de fármaco

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente en hombres mayores de 50 años. Con una tasa de mortalidad de 13 por cada 100,000 habitantes, representa la primera causa de muerte por cáncer en hombres mexicanos [1]. Uno de los fármacos administrados a pacientes en etapas avanzadas es la MTX, cuyo efecto citotóxico se debe a su unión con el ADN. Debido a su toxicidad inespecífica produce frecuentemente reacciones adversas como arritmias, neutropenia, trastornos gastrointestinales, concentración elevada de urea en sangre, alopecia, infecciones en tracto respiratorio superior y urinario, hemorragias, fiebre y amenorrea. También se han comprobado efectos clastogénicos y carcinogénicos [2].

Un reto de la nanotecnología es el desarrollo de vehículos de fármacos que permitan una liberación focalizada, con-

trolada y específica, evitando efectos secundarios en los pacientes, revolucionando la terapia farmacológica actual. Buscando cumplir dicho objetivo el grupo de trabajo ha desarrollado el sistema MAO que es un sistema con núcleo de magnetita para una liberación focalizada, funcionalizado con ácido oleico el cual le brinda propiedades hidrofóbicas que le permiten cargar a la MTX, y está encapsulado con el polímero policaprolactona (PCL) para controlar la liberación y facilitar su distribución. Sus propiedades físicas y químicas se encuentran caracterizadas por SEM, difracción de rayos X, FT-IR, TGA, DSL, medición de pH y potencial Z, mostrando resultados positivos y apoyando a la optimización de la síntesis. Dentro de la evaluación biológica *in vitro* se cuenta con estudios de viabilidad celular realizados en cultivos primarios de fibroblastos de rata [3-6]. Sin embargo, siguiendo las normas internacionales de la FDA es de importancia realizar estudios más a fondo de citotoxicidad y genotoxicidad sobre una línea celular de cáncer de próstata al ser éste el tejido diana del sistema propuesto [7].

II. METODOLOGÍA

El estudio realizado fue comparativo, evaluando tres sistemas: las nanopartículas MAO, el fármaco MTX, y las nanopartículas MAO cargadas con el fármaco MTX, los tres sistemas encapsulados con PCL. Se propuso evaluar citotoxicidad por la medición de la actividad enzimática mitocondrial mediante la técnica de MTT, buscando la concentración letal media (CL₅₀), la cual es un indicador de toxicidad aguda, y realizando una cinética de toxicidad a las 24, 48 y 72 horas. La genotoxicidad se evaluó por la medición de la ruptura de cadena de ADN mediante la técnica de análisis fluorométrico de ADN desnaturalizado (FADU), expresado en unidades de fluorescencia relativa. Las líneas celulares utilizadas en los ensayos de citotoxicidad fueron DU-145 proveniente de tejido humano epitelial canceroso de próstata, y como control HaCat, que es una línea celular de tejido no canceroso del mismo origen embriológico y de la misma especie. Para aumentar la sensibilidad en las pruebas de geno-

toxicidad se utilizó un cultivo primario de leucocitos humanos de un donador sano.

1) *Evaluación de la citotoxicidad:* Se descongeló y propago la línea celular DU-145 utilizando medio DMEM complementado con SFB al 5% y antibiótico al 1%. Se llenó una placa de 96 pozos con 100 μ l de suspensión celular a 7×10^4 células/ml. A las 24 horas, que es el tiempo en que se llega aproximadamente a una confluencia del 80%, se esterilizaron los tres nanosistemas (MAO, MAO-MTX, MTX) irradiándolos con luz UV por 10 min. De cada nanosistema se prepararon seis diluciones en escala logarítmica, desde 1% hasta 1×10^{-5} % utilizando como disolvente DMEM complementado. A los cultivos en microplaca se les retiró el medio y se añadió por cuadruplicado 100 μ l de cada solución con el nanosistema, dejando como control una serie sin exponer. A las 24 horas se retiró el medio y se agregó reactivo de MTT diluido en medio complementado a 100 μ g/ml, incubando por dos horas. Los cristales de formazán formados durante la reacción se homogenizaron durante 10 min con isopropanol ácido en un equipo de agitación a 100 rpm, leyendo absorbancia en lector de microplacas a 595 nm. A las repeticiones de las absorbancias obtenidas se les calculó el coeficiente de varianza considerando a los resultados menores de 15 como resultados confiables. La absorbancia promedio de las muestras sin exponer se consideró como viabilidad del 100%, con este dato se calculó la viabilidad de cada muestra relacionándola en una recta.

Una vez encontrada la concentración aproximada donde se ubica CL_{50} , es decir, donde el sistema mata al 50% de las células, se repitió el experimento esta vez utilizando cuatro concentraciones en escala exponencial cercanas a la concentración CL_{50} encontrada para poder determinar CL_{50} con mayor nivel de confianza. Se repitió el experimento con las mismas variables, esta vez utilizando la línea control HaCat, cuyo medio de cultivo es DMEM complementado con SFB al 7% y antibiótico al 1%, midiendo con MTT a las 24 horas. Una vez identificado CL_{50} se elaboró una cinética de citotoxicidad, preparando tres microplacas con DU-145, realizando MTT a las 24, 48 y 72 horas.

2) *Evaluación de la genotoxicidad:* Para medir la genotoxicidad de los sistemas se tomó bajo consentimiento informado aproximadamente 5 ml de sangre venosa de un donador sano. Se aislaron los leucocitos por gradiente de densidad y se preservaron en suspensión en medio RPMI-1640 sin suero. A las 24 horas se prepararon alícuotas de 1 ml a 5×10^4 células/ml y se expusieron con los nanosistemas en

las mismas concentraciones utilizadas con anterioridad. Pasadas las 24 horas de exposición se midió la ruptura de ADN mediante la técnica FADU. Se lisaron las células por adición de NaOH 0.1 M, y se neutralizó con HCl 1 M. Se utilizó como marcador fluorescente bis-benzamida 1.25 μ M, leyendo en espectrofluorómetro a $\lambda_{ex}=375$ nm y $\lambda_{em}=450$ nm. Como controles se utilizaron muestras sin exposición y muestras expuestas a benzo(a)pireno al 10 μ M en DMSO al 0.5%.

III. RESULTADOS

A. Evaluación de la citotoxicidad

Se muestra en la Fig. 1. la gráfica de las viabilidades obtenidas en concentraciones del 1% al 1×10^{-5} %. Se puede observar que CL_{50} se encuentra en un rango entre 0.01% y 1% de concentración, por lo que las concentraciones elegidas para acercarnos a CL_{50} con mayor precisión fueron 1%, 0.5%, 0.25%, y 0.125%. En la Fig. 2. se muestran los resultados obtenidos a mencionadas concentraciones, encontrando un CL_{50} aproximado de 0.8% en los nanosistemas de MAO-MTX y MTX, mientras que MAO no presenta CL_{50} al no ser citotóxica. Los resultados de la comparación de la citotoxicidad en la línea DU-145 contra la línea HaCat se observan en la Fig. 3. Los resultados de la cinética de citotoxicidad realizados con MTT en DU-145 para MAO se pueden observar en la Fig. 4., para MAO-MTX en la Fig. 5., y para MTX en la Fig. 6. En MAO no existen cambios significativos, sin mostrar citotoxicidad en las primeras 72 horas de exposición. En los sistemas MAO-MTX y MTX se observa un aumento de viabilidad a las 72 horas, por lo cual es posible indicio de supervivencia y proliferación celular por parte de las células que no murieron a las 24 horas de exposición.

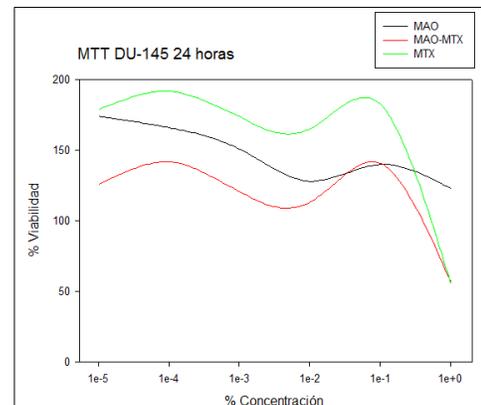


Fig. 1. Medición de citotoxicidad con MTT a las 24 horas. Concentraciones de 1% a 1×10^{-5} %. Se observa que a concentraciones menores de 0.01% ninguno de los tres nanosistemas tiene la capacidad de producir muerte celular.

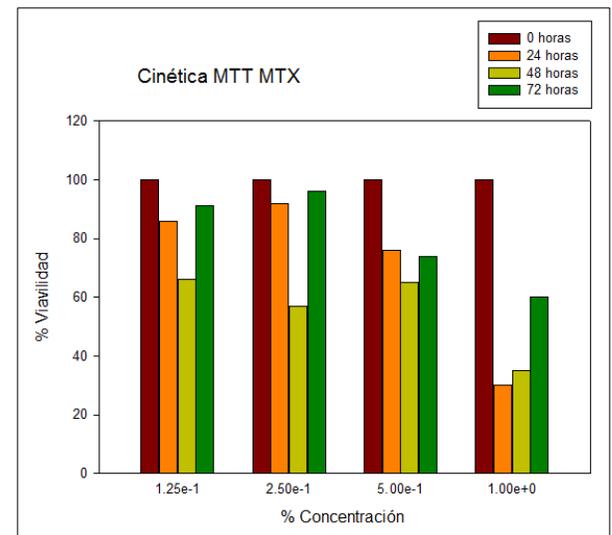
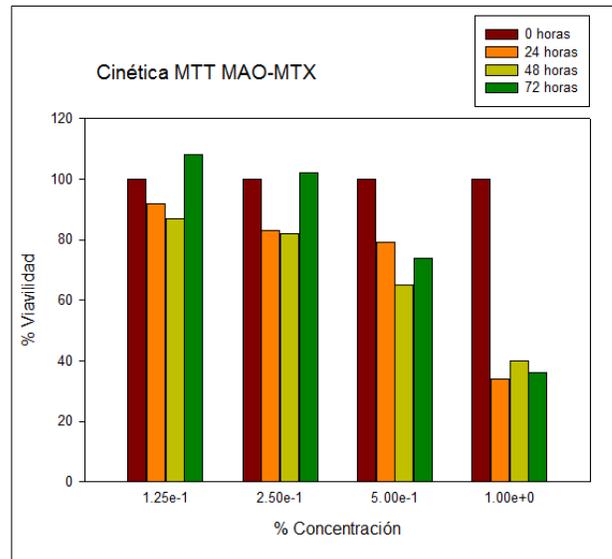
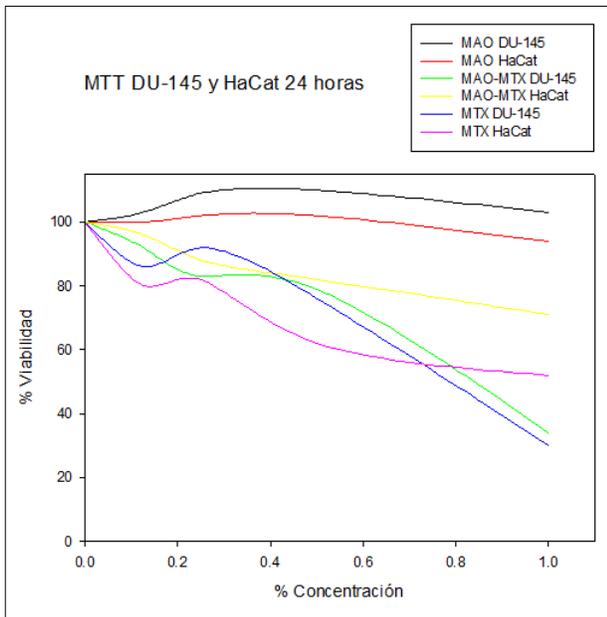
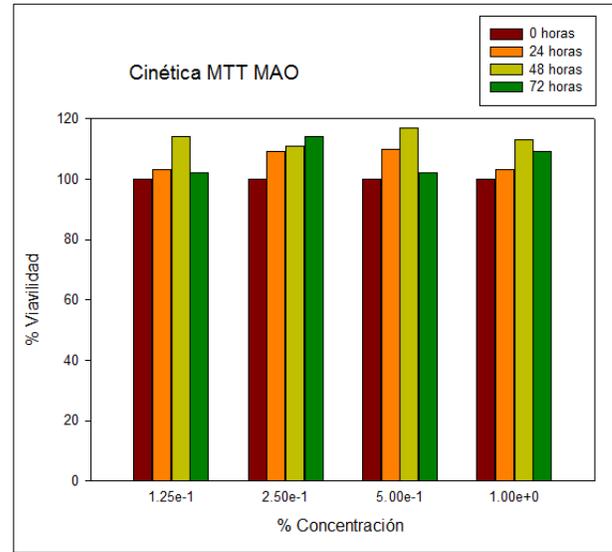
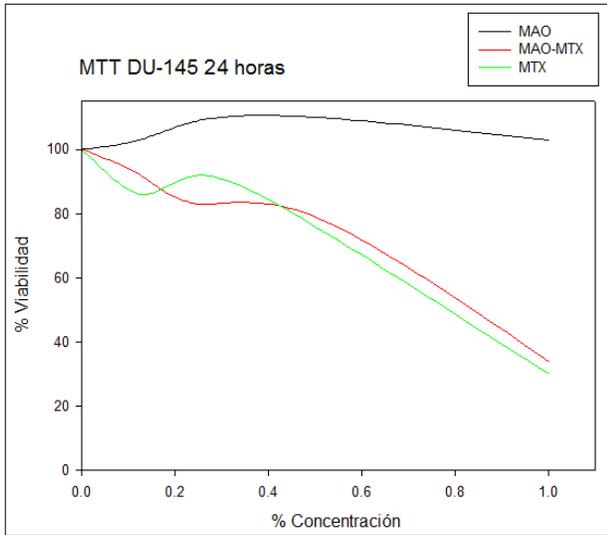


Fig. 2. (Arriba izq.) Medición de la citotoxicidad con MTT a las 24 horas. Concentraciones de 0.125% a 1%. Se observa en los sistemas con fármaco que a mayor concentración mayor citotoxicidad, con una CL_{50} aproximada de 0.8% de concentración. Las nanopartículas solas no provocan muerte celular a ninguna concentración. **Fig. 3.** (Abajo izq.) Comparación de la citotoxicidad en DU-145 contra HaCat. Se observan comportamientos similares a los obtenidos en DU-145, destacando que el nanosistema MAO sigue sin presentar citotoxicidad. MAO-MTX muestra una mayor afinidad por matar células cancerosas, siendo más evidente este comportamiento a concentraciones mayores del 0.1%. MTX presenta mayor citotoxicidad sobre células no cancerosas, cambiando este comportamiento a concentraciones mayores del 0.7%. **Fig. 4.** (Arriba der.) Cinética de citotoxicidad de MAO. Se observa que no existe muerte celular a ninguna concentración dentro de las primeras 72 horas de exposición. **Fig. 5.** (Centro der.) Cinética de citotoxicidad para MAO-MTX. Se observa en las muestras con concentraciones menores del 0.5% un aumento en la viabilidad celular después de las 72 horas.

Fig. 6. (Abajo der.) Cinética de citotoxicidad para MTX. Se observa aumento en la viabilidad celular después de las 72 horas.

B. Pruebas de genotoxicidad

El control negativo indicó una absorbancia de 0.0, lo que es un indicativo de que no existió ruptura del ADN, mientras que el control positivo arrojó una absorbancia de 6.6. Con excepción de MAO al 1% todos los nanosistemas presentaron una absorbancia de 0.0, lo cual demuestra inexistencia de genotoxicidad. En el caso de MAO al 1% la absorbancia promedio fue de 5.38, la cual es cercana al control positivo, indicando presencia de genotoxicidad.

VI. DISCUSIÓN

Analizando los resultados obtenidos se puede deducir que el vehículo propuesto no es citotóxico a ninguna concentración, ya que las absorbancias obtenidas son similares a las obtenidas en las muestras sin exponer a ningún agente, tanto en experimentos realizados sobre la línea celular cancerosa como en la no cancerosa. Las muestras con MTX y con MAO-MTX si producen muerte sobre las células, sin embargo, hay evidencia de que las células sobrevivientes vuelven a proliferar a las 72 horas. Esta proliferación de las células supervivientes es mayor en muestras que solo contenían MTX que en muestras que tenían MAO-MTX, por lo que se evidencia una ventaja de la utilización del vehículo MAO. En la comparación con HaCat se evidencia que existe una especificidad del fármaco a actuar en células cancerosas sobre células no cancerosas, esto únicamente a concentraciones mayores de CL₅₀.

Algunos compuestos no son lo suficientemente tóxicos como para producir muerte celular, pero si tienen la capacidad de fomentar un daño a nivel de ADN, lo cual es perjudicial ya que este daño génico puede ser indicio de mutaciones que pueden llevar al desarrollo de cáncer. Los resultados obtenidos en el estudio FADU revelan que las únicas muestras que producen rupturas en las cadenas de ADN son las muestras MAO a concentraciones altas, alrededor del 1%, esto debido a que elementos férricos como la magnetita tienden a formar especies reactivas de oxígeno mediante la reacción fenton la cual produce daño oxidativo al ADN. Sin embargo, este daño no se evidencia en muestras con concentraciones menores del 1%, por lo que si se considera seguro el uso de MAO a estas concentraciones.

V. CONCLUSIÓN

Se concluye que el vehículo propuesto es viable debido a su carencia de citotoxicidad, ya que es difícil el diseñar un sistema funcional que al interactuar con el paciente no perju-

dique con un afecto adverso, tal como muerte, daño tóxico o daño en el ADN. Basándose en estos resultados se demuestra que no existe daño tóxico alguno a nivel celular, siempre y cuando se utilice en una concentración cercana al 0.8%, ya que es la concentración en la cual el fármaco mata alrededor del 50% de las células. Si se administran concentraciones más bajas se corre el riesgo de que las células sobrevivientes vuelvan a proliferar, y si se administran concentraciones más altas la magnetita puede provocar efectos genotóxicos.

Como recomendaciones de pruebas *in vitro* a realizar antes de pasar a estudios *in vivo* están el realizar estudios más a fondo de genotoxicidad como ensayos de formación de aductos nanopartícula-ADN, citogenética para determinación de aberraciones cromosómicas, ensayos de clonogenicidad para determinar capacidad proliferativa de células supervivientes, ensayos de mutagénesis y de carcinogénesis.

RECONOCIMIENTOS

Agradecimientos a los investigadores y alumnos involucrados tanto en la síntesis del material como en las pruebas de seguridad biológica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. A. Jiménez Ríos, M. Solares Sánchez, P. Martínez Cervera, J. L. Aguilar Ponce, J. Martínez Cedillo, J. Hinojosa Gómez, L. Rivera Rubí y J. Zamora Moreno. "Oncoguía: cáncer de próstata" *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, vol. 6, no. 1, pp. 13-18, Mar. 2011.
- [2] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2011, Oct). *Ficha técnica mitoxantrona* [en línea]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/66166/FT_66166.pdf
- [3] J. A. Roacho Pérez. "Estandarización de cultivos primarios de fibroblastos de rata para la evaluación citotóxica de materiales con fines biomédicos". Proyecto de titulación, programa de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México, 2013.
- [4] S. E. Obregón Rubio "Síntesis, caracterización y funcionalización de un sistema de MNPs @ OA, para su potencial uso en carga y liberación de fármacos". Proyecto de titulación, programa de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México, 2013.
- [5] A. V. López Salazar "Elaboración de nanocápsulas de poli-caprolactona (PCL) preformado con núcleo magnético para posibles aplicaciones en la liberación modificada de fármacos". Proyecto de titulación, programa de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México, 2014.
- [6] C. D. Ávila Valenzuela "Formación de nanocápsulas de policaprolactona (PCL) preformado conteniendo benzocaína como sistema de transporte de fármaco". Proyecto de titulación, programa de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México, 2014.
- [7] Acto de la Administración de Alimentos y Fármacos, *Medical Device Amendment of the U.S., 1976*.