



**“Evaluación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de hierro, sobre células de
cáncer hepático (Hep G2) y células normales de pulmón (IMR-90)”**

Lara Palacios, Jéssica Tatiana

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D. PhD.

28 de septiembre del 2020



Document Information

Analyzed document	Proyecto de Titulacion_Lara Tatiana 092020.docx (D79605302)
Submitted	9/22/2020 1:52:00 AM
Submitted by	
Submitter email	rmgrjalva@espe.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	rmgrjalva@espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	NADIA VERONICA ORTIZ GUAMAN..docx Document NADIA VERONICA ORTIZ GUAMAN..docx (D75813980)	11
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx Document PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx (D36574312) Submitted by: nmgomez@espe.edu.ec Receiver: rmgrjalva@espe@analysis.arkund.com	6
W	URL: https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-[] ... Fetched: 9/22/2020 1:54:00 AM	4
W	URL: https://urbanaffairsreview.com/2015/07/07/author-blog-the-formation-of-business-int ... Fetched: 9/22/2020 1:54:00 AM	1
W	URL: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/670895/calero_calero_macarena.pdf ... Fetched: 2/17/2020 7:01:28 PM	3
SA	submission.pdf Document submission.pdf (D63931342)	2
W	URL: https://www.researchgate.net/publication/291350809_Desarrollo_de_un_sistema_de_lib ... Fetched: 5/17/2020 12:20:47 PM	1

Handwritten signature



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "Evaluación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de hierro, sobre células de cáncer hepático (Hep G2) y células normales de pulmón (IMR-90)" fue realizado por la señorita Lara Palacios, Jéssica Tatiana, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditarlo y autorizar para que lo sustente Públicamente.

Sangolquí, 22 de septiembre del 2020

Firma:

Grijalva Silva, Marcelo Rodrigo M.D., Ph.D.

CI: 1706590641



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Lara Palacios, Jéssica Tatiana, con cédula de ciudadanía N° 1804011763, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Evaluación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de hierro, sobre células de cáncer hepático (Hep G2) y células normales de pulmón (IMR-90)" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 22 de septiembre del 2020

Firma:

Lara Palacios, Jéssica Tatiana

C.C. 1804011763



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, Lara Palacios, Jéssica Tatiana, con cédula de ciudadanía n° 1804011783, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación "Evaluación del efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de hierro, sobre células de cáncer hepático (Hep G2) y células normales de pulmón (IMR-90)" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 22 de septiembre del 2020

Firma:

Lara Palacios, Jéssica Tatiana

C.C. 1804011783

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Adelita y Geovanni, mi más grande aliento, que a diario dan todo de sí mismos para que yo pudiera cumplir esta meta. Quienes en todo este trayecto no han descansado ningún momento con tal de brindarme las oportunidades que ellos no tuvieron.

A mi abuelo Manuel, quién me guio al camino de la ciencia. A mis abuelos Gregorio, Piedad y Carmelina en donde yo he podido encontrar conocimiento e inspiración.

A mis hermanos Karen, Nicolás y Sebastián, mi soporte, mi fuente de constancia.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas y entidades que hicieron posible el desarrollo de este trabajo. A la Universidad de las Fuerzas Armadas, por ser el sitio donde me forme. A todos los maestros de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, por el conocimiento que me impartieron durante mis años de estudio.

Al Dr. Marcelo Grijalva, por la confianza al abrirme las puertas de su laboratorio y servir de guía en todo este proceso de investigación.

Un agradecimiento especial a la Ing. Lizeth Salazar y al Ing. David Carchi por su interés, sus consejos y trabajo constante, por brindarme su conocimiento e instruirme en cada paso de este transcurso.

Al Centro de Nanociencia y Nanotecnología por el acceso a recursos y materiales para la síntesis y caracterización de las nanopartículas utilizadas en este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Judith, John, Sophia, Michelle, Abigail, Kirsty, Pao y Karen, por ser partícipes del trayecto de este proyecto de grado. Por las palabras de aliento, las horas de trabajo compartidas y las ideas intercambiadas.

A Francisco, Angy, Esteban, Giuliette, Pedro José, Richard, quienes me han brindado su apoyo y cariño, y me han hecho crecer como persona y estudiante.

Índice de Contenidos

Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Resumen.....	18
Abstract	19
Capítulo I: Introducción.....	20
Antecedentes.....	20
Justificación e Importancia.....	22
Objetivos del Trabajo de Titulación.....	25
<i>Objetivo General</i>	25
<i>Objetivos Específicos</i>	25
Hipótesis de investigación	25
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	26
Cáncer.....	26
<i>Carcinoma hepático</i>	27
<i>Factores de riesgo del cáncer y CHC</i>	28
<i>Agentes químicos y farmacéuticos</i>	28
<i>Virus, bacterias y hongos</i>	29
Nanopartículas y sus aplicaciones.....	30
<i>Generalidades</i>	30
<i>Tipos de Nanopartículas y Clasificación</i>	31
<i>Nanopartículas de óxido de Hierro</i>	32
<i>Caracterización de Nanopartículas</i>	35

Metabolismo celular del hierro	37
Estrés Oxidativo	39
<i>Detección de ROS por citometría de flujo</i>	40
Muerte celular.....	41
<i>Apoptosis</i>	42
<i>Necrosis</i>	43
<i>Autofagia</i>	44
<i>Ferroptosis</i>	45
Capítulo III: Metodología de la Investigación	46
Localización Geográfica y Participantes	46
Materiales y Métodos.....	46
<i>Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)</i>	46
<i>Curvas de crecimiento para las líneas de celulares HepG2 e IMR-90</i>	47
<i>Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares: carcinoma hepático (Hep G2) y fibroblastos de pulmón (IMR-90)</i>	47
<i>Ensayo MTT con las líneas celulares Hep G2 e IMR-90</i>	49
<i>Estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄) en condiciones de cultivo celular</i>	50
<i>Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)</i>	50
<i>Ensayo de estrés oxidativo</i>	51
Capítulo IV: Resultados.....	53
<i>Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)</i>	53
<i>Estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄) en condiciones de cultivo celular</i>	59
<i>Curvas de crecimiento para las líneas de celulares Hep G2 e IMR-90</i>	60

Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4).....	65
Ensayo de estrés oxidativo.....	70
Capítulo V: Discusión	79
Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4).....	79
Curvas de crecimiento para las líneas de celulares Hep G2 e IMR-90	80
Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4).....	83
Ensayo de estrés oxidativo.....	85
Capítulo VI: Conclusiones	87
Capítulo VII: Recomendaciones	88
Bibliografía	89
Anexos	100

Índice de Tablas

Tabla 1	<i>Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Fe₃O₄ medidas en el tiempo por DLS.....</i>	<i>59</i>
Tabla 2	<i>Análisis estadístico entre las líneas celulares Hep G2 e IMR-90.....</i>	<i>67</i>
Tabla 3	<i>Datos obtenidos del ensayo de estrés oxidativo en Hep G2</i>	<i>77</i>
Tabla 4	<i>Datos obtenidos del ensayo de estrés oxidativo en IMR-90.....</i>	<i>78</i>

Índice de Figuras

Figura 1	<i>Incidencia y mortalidad del cáncer de hígado a nivel mundial.....</i>	24
Figura 2	<i>Hallmarks del cáncer</i>	27
Figura 3	<i>Mecanismos de regulación del metabolismo del hierro intracelular.....</i>	38
Figura 4	<i>Modelo de dispersión de la luz en citometría de flujo</i>	41
Figura 5	<i>Clasificación de los tipos de muerte celular regulada.....</i>	42
Figura 6	<i>Rutas de activación de muerte celular por apoptosis</i>	43
Figura 7	<i>Distribución del ensayo de viabilidad celular a distintas concentraciones de NPs.....</i>	51
Figura 8	<i>Distribución del ensayo de estrés oxidativo a distintas concentraciones de NPs.....</i>	52
Figura 9	<i>Distribución de frecuencia de diámetro hidrodinámico de las FeNPs con PEG40.....</i>	53
Figura 10	<i>Distribución de frecuencia de diámetro hidrodinámico de las FeNPs sin PEG40.....</i>	54
Figura 11	<i>Diámetro hidrodinámico de nanopartículas de Fe₃O₄ medidas en el tiempo por DLS</i>	54
Figura 12	<i>Imágenes en TEM de las nanopartículas de Fe₃O₄ con cobertura PEG a los 7 y 30 días.....</i>	55
Figura 13	<i>Imágenes en TEM de las nanopartículas de Fe₃O₄ descubiertas a los 7 y 30 días.....</i>	56

Figura 14	<i>Resultados de XRD de las nanopartículas de Fe₃O₄ con y sin PEG a los 7 y 30 días.....</i>	<i>57</i>
Figura 15	<i>Resultados analizados de XRD de las nanopartículas de Fe₃O₄ con PEG a los 30 días</i>	<i>58</i>
Figura 16	<i>Resultados analizados de XRD de las nanopartículas de Fe₃O₄ sin PEG a los 30 días.....</i>	<i>58</i>
Figura 17	<i>Crecimiento de la línea celular Hep G2 a distintas densidades de siembra celular.....</i>	<i>60</i>
Figura 18	<i>Modelo del crecimiento de la línea celular Hep G2 a distintas densidades de siembra.....</i>	<i>61</i>
Figura 19	<i>Zona lineal de curvas del crecimiento de la línea celular Hep G2 de 24 a 96 horas.....</i>	<i>62</i>
Figura 20	<i>Zona lineal de curvas del crecimiento-línea celular Hep G2 de 48 a 96 h.</i>	<i>62</i>
Figura 21	<i>Crecimiento de la línea celular IMR-90 a distintas densidades de siembra celular</i>	<i>63</i>
Figura 22	<i>Modelado del crecimiento de la línea celular IMR-90 a distintas densidades de siembra</i>	<i>64</i>
Figura 23	<i>Zona lineal de la curva modeladas crecimiento - línea celular IMR-90 de 72 a 144 horas.....</i>	<i>64</i>
Figura 24	<i>Viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de exposición a NPs de Fe₃O₄.</i>	<i>66</i>
Figura 25	<i>Interacción de la concentración de FeNPs y tiempo de exposición- línea celular Hep G2</i>	<i>68</i>

Figura 26	<i>Interacción de la concentración de FeNPs y tiempo de exposición- línea celular IMR-90.....</i>	<i>69</i>
Figura 27	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 24 horas de exposición línea celular HepG2.....</i>	<i>71</i>
Figura 28	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 48 horas de exposición-línea celular HepG2.....</i>	<i>72</i>
Figura 29	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 72 horas de exposición-línea celular HepG2.....</i>	<i>73</i>
Figura 30	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 24 horas de exposición-línea celular IMR-90</i>	<i>74</i>
Figura 31	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 48 horas de exposición-línea celular IMR-90</i>	<i>75</i>
Figura 32	<i>Ensayo de estrés oxidativo a las 72 horas de exposición-línea celular IMR-90</i>	<i>76</i>

Índice de Abreviaturas

µg/mL	Microgramos por mililitro
µl	Microlitros
µM	Micromolar
ACD	Muerte celular accidental (siglas en inglés)
Apaf-1	Factor activador de proteasa apoptótico-1 (siglas en inglés)
ARN	Ácido ribonucleico
BSI	Institución de Estándares Británica (siglas en inglés)
CENCINAT	Centro de Nanociencia y Nanotecnología
CHC	carcinoma hepatocelular
CO₂	Dióxido de carbono (siglas en inglés)
DISC	Complejo de señales de inducción de muerte (siglas en inglés)
DLS	Dispersión de la luz dinámica (siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS₀	Densidad de siembra inicial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (siglas en inglés)
EO	Estrés oxidativo
EPA	Agencia de Protección Ambiental (siglas en inglés)
EPR	Permeabilidad y retención mejoradas (siglas en inglés)
FDA	Administración de Alimentos y Drogas (siglas en inglés)

Fe₃O₄	Óxido de hierro (III)-magnetita
FeNPs	Nanopartículas de óxido de hierro Fe ₃ O ₄
GR	Glutación reductasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
h	Hora
Hep G2	Línea celular de carcinoma hepático
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (siglas en inglés)
IMR-90	Línea celular de fibroblastos de pulmón
ISO	Organización Internacional de Estandarización (siglas en inglés)
MEM	Eagle Medio Mínimo Esencial (siglas en inglés)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (siglas en inglés)
ml	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (siglas en inglés)
NCCD	Nomenclatura del comité de muerte celular (siglas en inglés)
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (siglas en inglés)
NPs	Nanopartículas
O₂	Oxígeno singlete
O₂⁻	Radical superóxido
OH⁻	Radical hidroxilo

PBS	Tampón fosfato salino (siglas en inglés)
PEG	Polietilenglicol
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina
R²	Coefficiente de determinación
RCD	Muerte celular regulada (siglas en inglés)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio Dodecil Sulfato (siglas en inglés)
SOD	Superóxido dismutasa
SFB	Suero Fetal Bovino
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (siglas en inglés)
Tf	Transferrina
Fpn	Ferroportin
TLR	Receptor tipo Toll (siglas en inglés)
TNF-1	Factor de necrosis tumoral (siglas en inglés)
XRD	Difracción de rayos X (siglas en inglés)

Resumen

El cáncer hepático corresponde la tercera causa de muerte más frecuente por cáncer a nivel mundial. El uso de nanocompuestos es una alternativa a los tratamientos actuales, que permitiría disminuir problemas como fármaco-resistencia y biodisponibilidad. En el presente proyecto se sintetizaron nanopartículas de Fe_3O_4 por el método de co-precipitación con una cobertura de polietilenglicol (PEG) y se caracterizaron por DLS, XRD y TEM. Se evaluó la respuesta de citotoxicidad y estrés oxidativo ante las concentraciones 25-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PEG-NPs a las 24, 48 y 72 horas mediante los ensayos MTT y citometría de flujo en una línea celular de cáncer (HepG2) y en la línea celular IMR-90 (modelo celular normal). El diámetro hidrodinámico de las NPs-PEG fue de 96nm (DLS) y su tamaño individual de 9nm (TEM). Los ensayos de citotoxicidad no evidenciaron cambios significativos en la viabilidad celular a las 24 horas de exposición. A las 48 y 72 h, la línea IMR-90 demostró una viabilidad de 78 y 80%, respectivamente, mientras que la línea HepG2 presentó viabilidad de 66 y 54% en los mismos tiempos. El ensayo de estrés oxidativo mostró un aumento en niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en HepG2, que se mantuvo en el tiempo, mientras que la línea IMR-90 no evidenció cambios en la cuantificación de ROS con respecto al control sin exposición. Estos datos demuestran selectividad en el efecto citotóxico entre las líneas celulares HepG2 e IMR-90, dependiente de la dosis y el tiempo de exposición a las nanopartículas de Fe_3O_4 .

Palabras clave:

- **VIABILIDAD CELULAR**
- **ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**
- **ESTRÉS OXIDATIVO**

Abstract

Liver cancer is the third most common cause of death from cancer worldwide. Using Nanomedicine is an alternative to current treatments, which would reduce problems such as drug resistance and bioavailability. In this project, Fe₃O₄ nanoparticles were synthesized by the co-precipitation method with a polyethylene glycol (PEG) coating, and were characterized by DLS, XRD and TEM. The cytotoxicity response and oxidative stress were evaluated in a cancer cell line (HepG2) and in the IMR-90 cell line (normal cell model) with the concentrations 25-300 µg/mL of PEG-NPs at 24, 48 and 72 hours using MTT and flow cytometry assays. The hydrodynamic diameter of the NPs-PEG was 96nm (DLS) and their average individual size was 9nm (TEM). Cytotoxicity tests showed no significant changes in cell viability at 24 hours of exposure. At 48 and 72 h, the IMR-90 line showed 78 and 80% of viability, respectively, while the HepG2 line showed 66 and 54% viability at the same times. Oxidative stress testing showed increased levels of reactive oxygen species (ROS) in HepG2, that remained in time, while IMR-90 cell line did not show changes in the ROS quantification related to the control without exposure. These data demonstrate selectivity in cytotoxic effect between HepG2 and IMR-90 cell lines, dependent on dose and time of exposure to the Fe₃O₄ nanoparticles.

Keywords:

- **CELL VIABILITY**
- **REACTIVE OXYGEN SPECIES**
- **OXIDATIVE STRESS**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El uso extendido de líneas celulares en la investigación ha impulsado el desarrollo de terapias en diferentes campos de la medicina, de hecho, ha sido esencial en el descubrimiento de drogas contra el cáncer, sirviendo como un modelo *in vitro* que simula el comportamiento de las células cancerígenas y permitiendo realizar numerosas pruebas con diferentes compuestos (Mirabelli, Coppola, & Salvatore, 2019). De manera particular, la línea celular HepG2 ha sido ampliamente utilizada como modelo del carcinoma hepatocelular (CHC), una neoplasia maligna de hígado, que corresponde al tercer tipo de cáncer con mayor mortalidad en el mundo (Ferlay et al., 2015).

Según Yang et al. (2019) el riesgo de contraer CHC aumenta en presencia de otras enfermedades, como hepatitis B y C, hígado graso, consumo alcohol, cirrosis o tras la exposición a hepatotoxinas. De hecho, el hígado es un órgano que se encuentra constantemente expuesto a agentes xenobióticos que pueden generar daño oxidativo en los hepatocitos, pudiendo desembocar en cáncer (Deferme, Briedé, Claessen, Cavill, & Kleinjans, 2015). El estrés oxidativo en las células se debe a los altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que no solo influyen en la carcinogénesis si no, que también poseen una importante función en la proliferación, angiogénesis y metástasis del tumor (Gorrini, Harris, & Mak, 2013).

Las ROS son moléculas que contienen oxígeno reactivo, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo ($\cdot OH$) y superóxido ($\cdot O_2$). Estas moléculas son originadas normalmente por el organismo, ciertamente, muchas de ellas desempeñan papeles importantes en células normales (un ejemplo de ello es el H_2O_2 que es conocido como segundo mensajero de varias rutas celulares), pero el incremento de las ROS crea un

desbalance redox que provoca daños al ADN y altera la señalización y funciones celulares (Aggarwal et al., 2019). Diferentes estudios han encontrado que, en comparación con las células normales, las células de cancerígenas poseen niveles de ROS incrementados, pero al igual que las células normales necesitan mantener el equilibrio redox (Harris et al., 2015). Este equilibrio funciona con el incremento de enzimas antioxidantes en el citoplasma y en la mitocondria; siendo clave la acción de las enzimas superóxido dismutasa (*SOD*), glutatión reductasa (*GR*) y tiorredoxina 1 (*Trx1*), las mismas que han visto implicadas en la resistencia a drogas anticancerígenas (Noda & Wakasugi, 2001).

Por otro lado, el estrés oxidativo también puede ocurrir por una acumulación de hierro en la célula, debido a su interacción con las ROS propias de la célula (especialmente el $\cdot\text{O}_2^-$ y el H_2O_2). Enfermedades como la cirrosis, la fibrosis, hematomacrosis y cáncer se han encontrado relacionadas con la disminución del nivel de hierro sérico, pero con el aumento del hierro celular (X. Huang et al., 2002).

Varios tratamientos buscan alterar el pequeño equilibrio redox que hace a las células cancerígenas más sensibles a la acumulación de ROS (Liu & Wang, 2015). Se han obtenido resultados preliminares sobre la elevada toxicidad que puede tener el peróxido de hidrógeno en la línea celular Hep G2 (Aguilar, 2014). Pero necesitan más investigaciones para determinar la sensibilidad que posee esta línea celular de CHC ante estrés oxidativo, tomando en cuenta las enzimas que puedan actuar en este proceso.

Justificación e Importancia

El CHC corresponde al cáncer de hígado primario de mayor frecuencia, a nivel mundial es el quinto tipo de cáncer más común y la tercera causa más frecuente de cáncer/muerte, con una tasa de incidencia más acentuada en hombres (17,4) que en mujeres (8,7) (Global Burden of Disease Cancer, 2017). En América Latina se conoce una baja incidencia de CHC, pero en los últimos años Ecuador ha pasado de ser un país de baja a mediana incidencia, mientras Perú y Bolivia llegó a una alta incidencia (Figura 1) (Yang et al., 2019). La tasa de supervivencia de esta enfermedad a 5 años en las etapas: localizado, regional y distante es de 31%, 1% y 2%, respectivamente y todas las etapas combinadas tendrían una tasa del 18% (American Cancer Society, 2019). El riesgo de contraer esta enfermedad aumenta de manera considerable tras infecciones con virus de hepatitis B o C y cirrosis (80% de casos globales de CHC). En países desarrollados, la enfermedad de hígado graso se ha registrado como alto factor de riesgo mientras que la diabetes (que incrementa de 3 a 4 veces el desarrollo de CHC) afecta más a los países en vías de desarrollo. Además de estas enfermedades, las aflatoxinas, una clase de micotoxinas contaminantes usuales de cereales y oleaginosas, también poseen un efecto hepatotóxico fuerte desencadenante de CHC (Yang et al., 2019).

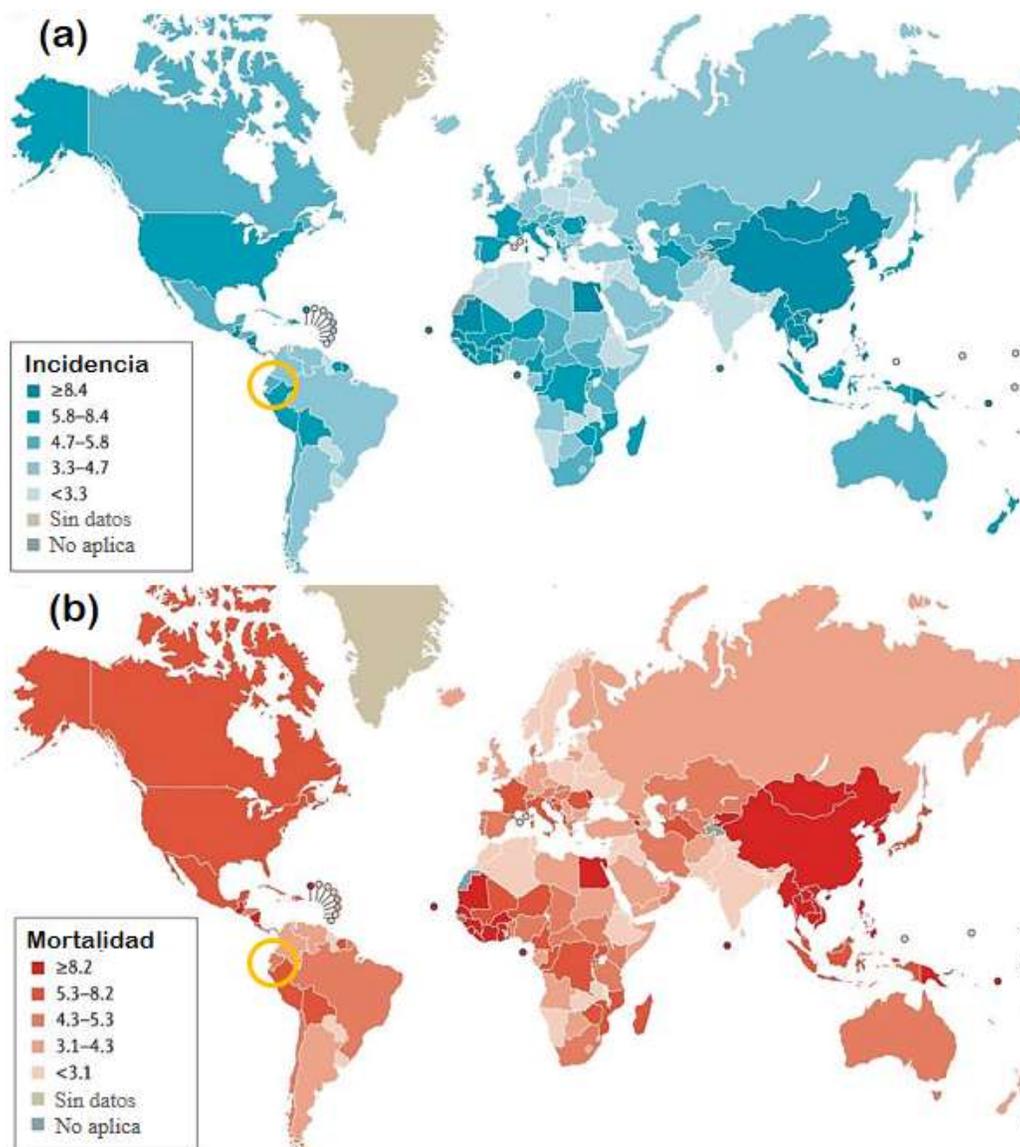
Múltiples esfuerzos se están dando tanto en el diagnóstico temprano, como en el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, la tasa de incidencia y la mortalidad se ha mantenido. Debido a que muchas alternativas de tratamiento atraviesan problemas de fármaco-resistencia, en la entrega, distribución, biodisponibilidad y tiempo de vida del medicamento dentro del organismo; si a esto se le añade la compleja arquitectura de la zona tumoral y de sus vasos sanguíneos, la eficacia del tratamiento se ve disminuida

considerablemente y aparecen los efectos secundarios (Mahmoud & Mohammad, 2019).

Diferentes estudios han destacado a la nanomedicina como una rama prometedora, que admite superar varias de estas barreras. El pequeño tamaño que poseen las nanopartículas (NPs) permite su penetración en tumores sólidos, incrementando eficacia terapéutica y reduciendo la toxicidad (Mahmoud & Mohammad, 2019). Un claro ejemplo es el uso de NPs conjugadas con drogas quimioterapéuticas que ya se han aprobado para tratar diferentes tipos de cáncer. De la misma forma, se han diseñado NPs con cobertura lipídica (e.g. ácido poli láctico-co-glicólico, poli etilenglicol, polilactida, etc.) que ayudan a mejorar la permeabilidad y retención (*EPR-enhanced permeability and retention*) del fármaco en la diana terapéutica (Maeda, Wu, Sawa, Matsumura, & Hori, 2000). Las NPs incluso pueden utilizarse como inductores de estrés oxidativo a nivel celular (Sharma, Anderson, & Dhawan, 2011). Por tanto, es posible investigar la capacidad de las NPs de originar estrés oxidativo en células cancerígenas (en este caso la línea celular Hep G2) como una prueba de concepto de un posible tratamiento para el CHC, apoyada en la ventaja espacio-temporal que ofrecen las NPs.

Figura 1

Incidencia y mortalidad del cáncer de hígado a nivel mundial



Nota: según datos del Global Burden of Disease Cancer (2017). (a) Mapa de la tasa de incidencia y (b) Mapa de la mortalidad. Encerrado en círculo Ecuador. Modificado de Yang et al. (2019).

Objetivos del Trabajo de Titulación

Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico de nanopartículas de óxido de hierro, sobre células de cáncer hepático (HepG2) y células normales de pulmón (IMR-90).

Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4).
- Definir la curva de crecimiento de la línea celular tumoral de hígado HepG2 y la línea celular normal de pulmón IMR-90.
- Examinar el efecto de las nanopartículas de óxido de hierro sobre la proliferación en las líneas celulares HepG2 y IMR-90.
- Estimar la inducción de estrés oxidativo de las nanopartículas de óxido de hierro en las líneas celulares HepG2 y IMR-90.

Hipótesis de investigación

Las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) tienen un efecto citotóxico mayor en células de carcinoma hepático Hep G2 que en células normales de pulmón IMR-90.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

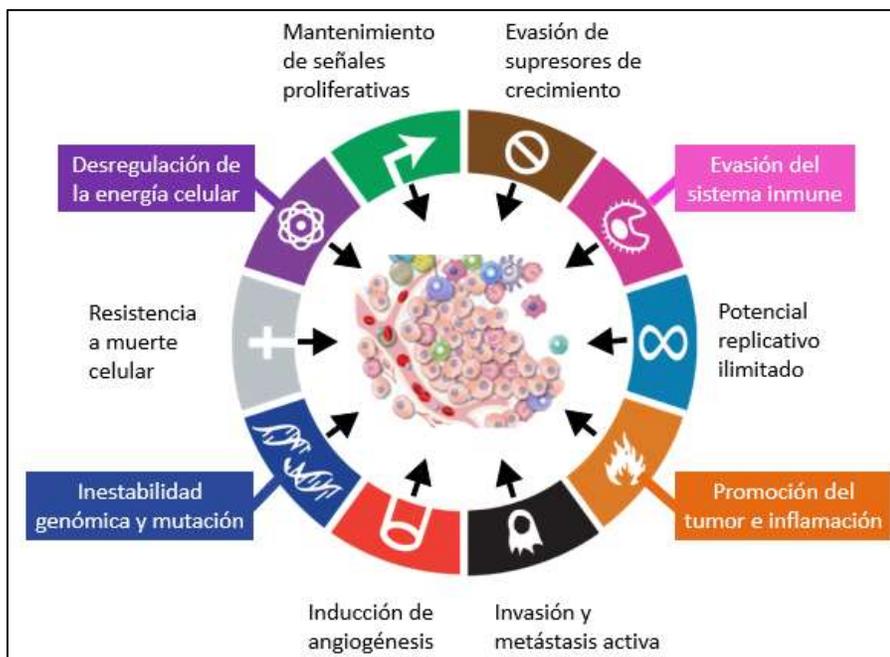
Cáncer

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades que poseen características comunes o vinculadas, que presentan células que no cumplen correctamente con sus funciones biológicas por su crecimiento y tienen una propagación descontrolada (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). La complejidad de este conjunto de enfermedades dificulta la obtención de tratamientos eficaces y seguros. En un intento por simplificarlo, en el año 2000 Hanahan y Weiberg se encargan de organizar las características biológicas del cáncer en 6 sellos distintivos denominados *hallmarks*, que una década más tarde pasaron a ser 10 *hallmarks* principales, con sus distintas subdivisiones (Figura 2).

Estas características son promovidas por mutaciones genéticas en las células normales debido a errores en el proceso de replicación del ADN, defectos en el sistema de reparación del ADN o daños por agentes endógenos o exógenos. La muerte y regeneración celular evitan que estas mutaciones se acumulen o persistan en otras células. Sin embargo, las células cancerígenas evaden la muerte celular programada o apoptosis, que las células normales realizan al envejecer o dañarse para ser reemplazadas por nuevas células, y continúan con una división descontrolada que puede resultar en displasias, hiperplasias y tumores. La evidencia aclara que el cáncer tiene un origen multifactorial que depende de factores genéticos y ambiental (Acuña et al., 2017).

Figura 2

Hallmarks del cáncer



Nota: En color violeta, azul, naranja y fucsia los 4 hallmarks añadidos después de una década. Modificado de (Hanahan & Weinberg, 2011)

Carcinoma hepático

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una malignidad en el hígado. Corresponde al cuarto tipo de cáncer de mayor concurrencia alrededor del mundo. Tiene una tasa de incidencia mayor en hombres que en mujeres. En la primera etapa el tratamiento innegable es la cirugía o trasplante de hígado. En otros casos se ha utilizado la destrucción de células cancerosas por métodos fisicoquímicos como: calor o frío, quimioterapia, radioterápica, inmunoterapia. Sin embargo, persiste la necesidad de buscar nuevas soluciones terapéuticas, pues este tipo de cáncer suele tener gran agresividad (Savitha, Vishnupriya, & Krishnamohan, 2017).

La línea celular Hep G2 se ha utilizado ampliamente como modelo del CHC. Este tipo celular corresponde a células epiteliales cultivadas, pertenecientes a un varón caucásico de 15 años por Knowles y colaboradores en 1980 (ATCC, 2006).

Factores de riesgo del cáncer y CHC

El cáncer tiene un origen multifactorial (genes+ambiente). Los genes envueltos directamente en toda la cadena de procesamiento de xenobióticos, la respuesta inmune del sistema o el proceso inflamatorio que se puede iniciarse ante algún invasor. El ambiente que puede marcar la exposición definida a todos estos agentes dependiendo de la ubicación geográfica de una persona, de la sociedad, bajo el sistema en el que vive y que puede modificar el riesgo de contraer cierta enfermedad con solo cambiar su ubicación. Como la diferencia entre el tipo de cáncer que más incide en países desarrollados contra los que están en vías de desarrollo y los no desarrollados (Clavel, 2007).

Agentes químicos y farmacéuticos

Existen múltiples compuestos que pueden promover la formación de cáncer. Los primeros estudios vincularon la ocupación de los trabajadores y el tipo de cáncer que desarrollaban. Los trabajadores en contacto con hollín y/o alquitrán presentaron cáncer de escroto, a los mineros se les diagnosticó cáncer de vejiga, mientras que a los radiólogos cáncer de piel (Blackadar, 2016). Así que se empezaron muchos análisis para definir que agentes exógenos provocan este mal o incrementan el riesgo de contraerlo. Se encontraron que componentes del hollín, asbestos, alquitrán, compuestos químicos usados en limpieza, desinfección e industrias, herbicidas y tintes, e incluso productos farmacéuticos (analgésicos quimioterapéuticos, etc.) como promotores causales de este conjunto de enfermedades denominado cáncer. Ahora se reconocen a

estos agentes y a otros muchos dentro de 3 grupos de clasificación determinados por la IARC (International Agency for Research on Cancer): en el grupo 1 a los carcinogénicos para los humanos, en el grupo 2 a los probablemente carcinogénicos para los humanos y en el grupo 3 a los compuestos que aún no tiene clasificación (International Agency for Research on Cancer, 2020).

A partir de 1940 el cigarrillo como un promotor de cáncer de pulmón, sobre todo con el consumo abusivo. consumo de alcohol, de hormonas, la exposición a la radiación ultravioleta, la obesidad, la falta de ejercicio, también contribuyen a la formación de cáncer (Blackadar, 2016).

Virus, bacterias y hongos

En la búsqueda de otros factores que influyeran en el desarrollo de tumores malignos algunos investigadores voltearon su pensamiento en que las enfermedades los microorganismos exógenos podían intervenir. El descubrimiento de los virus, como agentes parasitarios del organismo (Reed, Cakroll, Agramonte, & Lazear, 1901), incentivó investigaciones como el proyecto virus en cáncer del Cancer National Institute en 1968, que ligó la presencia de virus con la de tumores malignos (Gardener, 1994). Fruto de estas investigaciones se hallaron al retrovirus que provoca leucemia de células-T humanas (HTLV-1), el papiloma virus (HPV), los virus de la hepatitis C y B (HBV y HCV) que desencadenantes del CHC y a retrovirus (HERV) que pueden causar cáncer de mama en mujeres o de colón en otras personas (Blackadar, 2016).

De la misma forma, se halló que los parásitos, hongos y bacterias también pueden contribuir a la formación de tumores malignos. Los helmintos *Schistosoma haematobium* en la sangre y vejiga, o *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis* en el hígado son considerados como carcinógenos en humanos y animales (Botelho &

Richter, 2019). De igual forma, las aflatoxinas (en especial la Aflatoxina B1) producidas por el hongo *Aspergillus flavus* en productos alimenticios mal almacenados, y bacterias como *Helicobacter pylori* en el estómago pueden generar úlceras, inflamación y cáncer (Hamid, Tesfamariam, Zhang, & Zhang, 2013; J. Huang, Sridhar, Chen, & Hunt, 1998).

Nanopartículas y sus aplicaciones

Generalidades

La nanotecnología se ha convertido en los últimos años en un campo de creciente investigación y desarrollo, principalmente por las distintas aplicaciones tecnológicas que abarcan campos de estudio como la biología, la biomedicina, la ciencia de materiales, la electrónica, las energías renovables, la remediación ambiental e incluso la industria mecánica (Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, & Danquah, 2018; Khan, Saeed, & Khan, 2019).

A pesar del desarrollo e investigación en este campo, aún no existen definiciones que cuenten con la aprobación o el consenso internacional, lo que dificulta la legislación y regulación alrededor de los nanomateriales. Organismos como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la agencia de Administración de Alimentos y Drogas (FDA) estadounidenses, La Organización Internacional de Estandarización (ISO) o la Institución de Estándares Británica (BSI) han mostrado diferencias en cuanto a sus opiniones para definir las nanopartículas y nanomateriales. Un nanómetro es una medida de longitud del sistema internacional de medidas que equivale a 10^{-9} metros. Una concepción generalmente aceptada es que las nanopartículas se refieren a materiales cuyas dimensiones están entre 1-100nm, las nanociencias son el estudio de la materia a escalas nanométricas comprendiendo como el tamaño y estructura de la

materia deriva en distintas propiedades, y la nanotecnología es la manipulación y control de la materia en escala nanométrica con distintas aplicaciones

Tipos de Nanopartículas y Clasificación

Existen varios criterios que sirven para clasificar a los nanomateriales, como son por su composición química, por su tamaño y dimensiones, o por su origen.

Por su composición Química. La composición química de las nanopartículas permite dividir las en cuatro grupos mayores que se distinguen entre sí por sus propiedades, y también por las aplicaciones que pueden ofrecer.

Nanopartículas a base de carbono (C). Generalmente contienen carbono y se encuentran en forma de láminas que al plegarse conforman tubos, elipsoides o esferas. Entre los ejemplos de este tipo de nanopartículas se encuentran los nanotubos y nanofibras de carbono, fullerenos, el negro de humo y el grafeno (Jeevanandam et al., 2018).

Nanopartículas inorgánicas. La composición variable de las nanopartículas inorgánicas otorga versatilidad en cuanto al tamaño y morfología, además de características físicas y mecánicas distintas que brindan oportunidades en nuevas aplicaciones. En este grupo se encuentran las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos; también aquellas con propiedades semiconductoras como las nanopartículas de silicio y las nanopartículas cerámicas (Jeevanandam et al., 2018).

Nanopartículas orgánicas. Estas nanopartículas hacen uso de interacciones no covalentes débiles para el diseño y autoensamblaje de nanomateriales a partir de materia orgánica. Así se obtienen estructuras de interés como liposomas, micelas,

dendrimeros y nanopartículas poliméricas (Jeevanandam et al., 2018; Wang & Qiu, 2016).

Nanopartículas compuestas. También llamadas nanopartículas multicomponentes, alteran las propiedades de los nanomateriales dependiendo de su aplicación a través de la combinación de distintas nanopartículas o nanopartículas con materiales más grandes. Así se obtienen nano fibras híbridas o nanomateriales organometálicos (Jeevanandam et al., 2018; Khan et al., 2019).

Por su tamaño. Dado que la forma y dimensión de las nanopartículas afecta sus propiedades físicas y químicas, este es un aspecto a considerarse. Las estructuras de los distintos nanomateriales también pueden ser según su aplicación: de cero dimensiones (0D) como los puntos cuánticos, de una sola dimensión (1D) como las nanofibras, bidimensionales (2D) como el grafeno o tridimensionales (3D) como los liposomas, dendrimeros o estructuras policristalinas (Jeevanandam et al., 2018)

Por su origen. Aparte de los criterios de composición o tamaño de las nanopartículas, estas también pueden dividirse por su origen en naturales y sintéticas. Las nanopartículas naturales son aquellas que ocurren en la naturaleza o como producto de la actividad biológica, y se encuentran presentes en la atmósfera, hidrósfera, litósfera y biósfera. En cambio las nanopartículas sintéticas o de ingeniería se producen por trituramiento mecánico, humo y escape de motores, o se sintetizan con métodos físicos, químicos, biológicos o híbridos (Jeevanandam et al., 2018).

Nanopartículas de óxido de Hierro

Los compuestos de óxidos de hierro existen en varias formas en la naturaleza. Entre las nanopartículas de hierro más estudiadas están las nanopartículas de hierro

cero valente (Fe^0), nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4). Sus propiedades fisicoquímicas varían en dependencia del estado de oxidación del hierro en su composición. La magnetita presenta características magnéticas debido a que en su composición presenta al hierro (Fe) en sus dos estados de oxidación (Fe^{2+} y Fe^{3+}), de ellos, el Fe^{2+} actúa como donador de electrones. La formación de la magnetita se caracteriza por la coloración negra de la solución. Sus características magnéticas lo convierten en uno de los materiales más apreciados por los investigadores (Koo, Ismail, Othman, Bidin, & A Rahman, 2019; Mohammed, Gomaa, Ragab, & Zhu, 2017; Yallapu, Foy, Jain, & Labhassetwar, 2010).

Tanto la forma, dimensión y método de síntesis afectan a las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita. Cuando las nanopartículas de magnetita tienen un radio menor a 20nm exhiben propiedades superparamagnéticas. Las nanopartículas superparamagnéticas han pasado de un magnetismo multidominio, a uno de dominio único, el cual no presenta interacciones magnéticas por sí mismas, y son capaces de llegar hasta su magnetización de saturación bajo la influencia de un campo magnético externo. Estas cualidades magnéticas evitan en las nanopartículas problemas de agregación. Las características de baja toxicidad, biocompatibilidad, dispersabilidad, alta área superficial con respecto al volumen, y la capacidad de unirse a otras moléculas además de la característica de ser controladas bajo campos magnéticos externos han hecho de las nanopartículas de hierro candidatas ideales para aplicaciones biomédicas (Ghazanfari, Kashefi, Shams, & Jaafari, 2016; Yew et al., 2020)

Imágenes de resonancia magnética. La resonancia magnética es uno de los métodos de diagnóstico más efectivos y usados en la ciencia médica actual. Esta técnica permite la visualización y diferenciación de tejidos y brinda información sobre la composición y estructura de los cuerpos. Este método utiliza agentes de contraste que

permiten distinguir entre distintos tejidos u órganos, en especial entre tejidos sanos y afectados. El creciente uso de nanopartículas de magnetita como agentes de contraste se debe a su comportamiento superparamagnético, menor toxicidad y mayor biocompatibilidad que otros agentes de contraste (Ghazanfari et al., 2016).

Tratamiento hipertérmico. La ausencia de interacciones magnéticas en las nanopartículas de magnetita y su capacidad de magnetizarse bajo la influencia de un campo magnético externo permiten que, al aplicar un campo magnético alterno de alta frecuencia, se libere un tipo de energía conocida como hipertermia magnética. Esta puede ser utilizada para aumentar la temperatura en tejidos afectados hasta 41-45 °C generando daños irreparables en células cancerígenas (Mohammed et al., 2017).

Radioinmunoterapia. Esta técnica trata del uso de isótopos radioactivos en dosis bajas, dirigidas mediante anticuerpos hacia células cancerígenas, con el fin de causarles daño a través de la liberación continua de radiación. Recientemente se ha reconocido como radionucleidos a las nanopartículas superparamagnéticas de magnetita. Estas además pueden llevar anexas otras especies de radionucleidos como el ^{188}Re que ha demostrado inducir a la muerte celular en células hepáticas diana específicas en modelos in vivo (Ghazanfari et al., 2016).

Caracterización de Nanopartículas

Después de la síntesis de las nanopartículas, el uso de métodos de caracterización permite evaluar y verificar las propiedades deseadas de morfología, composición, distribución de tamaños, tamaños de partícula y las propiedades magnéticas. Distintas técnicas pueden ser empleadas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (XRD), o la dispersión de luz dinámica (DLS) (Koo et al., 2019).

Microscopía Electrónica de Transmisión. La microscopía electrónica de transmisión es la técnica de microscopía electrónica más utilizada para la caracterización de nanopartículas ya que provee imágenes directas e información química de las muestras analizadas. Esta técnica consiste en un haz de electrones que se dirige hacia una muestra muy delgada, al interactuar con la muestra los electrones pueden dispersarse de manera elástica o inelástica, o no sufrir dispersión. Estos electrones dispersos son enfocados por una serie de lentes electromagnéticas que finalmente generan la imagen. A través de la microscopía electrónica de transmisión se puede obtener información sobre la agregación o dispersión de las nanopartículas además de ver la heterogeneidad en su forma y tamaño (Souza, Ciminelli, & Mohallem, 2016).

Esta técnica presenta también algunas desventajas y limitaciones que deben ser tomadas en cuenta al caracterizar una muestra de nanopartículas. Las muestras tienen que ser necesariamente evaluadas en un ambiente artificial y no pueden observarse en sus condiciones fisiológicas, además para imágenes de alta resolución el grosor de la lámina debe ser menor a 50nm lo que exige una preparación de la muestra que puede alterar su estructura. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de

transmisión también representan una parte minúscula de la muestra en un periodo de tiempo determinado, lo que deriva en un muestreo estadísticamente pobre. Para sortear las limitaciones y desventajas de la microscopía electrónica de transmisión, se suele usar para la caracterización de nanopartículas más de una técnica complementaria (Koo et al., 2019; Lin, Lin, Wang, & Sridhar, 2014; Souza et al., 2016).

Difracción de Rayos X (XRD). Se puede describir como el reflejo de un haz colimado de rayos X que choca con la estructura terciaria y planos cristalinos de un analito. Esta es la técnica predilecta de espectrometría de rayos X, cuando de resolver estructuras terciarias se trata. El uso de XRD brinda información sobre el tamaño, la forma y la estructura de las nanopartículas y muestra una alta resolución espacial a un nivel atómico. A pesar del amplio uso de esta técnica, la XRD presenta limitaciones cómo: dificultad del proceso de cristalogénesis, análisis desde un único estado de conformación o sitio de unión, la baja intensidad de rayos X difractados con respecto a la difracción de electrones en materiales de bajo número atómico, y que se limita únicamente a materiales cristalinos (Koo et al., 2019; Lin et al., 2014).

Dispersión de Luz Dinámica (DLS). La técnica de dispersión de luz dinámica permite obtener información sobre el tamaño de partículas, la distribución de tamaños y la aglomeración con respecto a las propiedades hidrodinámicas de una muestra en dilución o suspensión. Consiste en medir la fluctuación temporal de la intensidad de dispersión elástica de luz, debida al movimiento browniano de las partículas en una suspensión, y a las diferencias de velocidades de movimiento que están relacionadas con su tamaño. El uso de DLS para la caracterización de nanopartículas presenta las siguientes ventajas: Corta duración del experimento y reproducibilidad de resultados, determinación del tamaño hidrodinámico en muestras monodispersas, analizar muestras diluidas en un amplio rango de concentraciones y detección de pequeñas

cantidades de partículas con mayor tamaño molecular, además de los costos relativamente bajos en cuanto a equipos. Sin embargo, también presenta las siguientes limitaciones y desventajas: dificultad para analizar muestras con una variedad de tamaños o polidispersas, dificultad para correlacionar fracciones de tamaño con la composición de las nanopartículas en presencia de agregados, o que el análisis asume la forma esférica de las partículas imposibilitando el análisis de nanopartículas con distintas morfologías (Koo et al., 2019; Lin et al., 2014).

Metabolismo celular del hierro

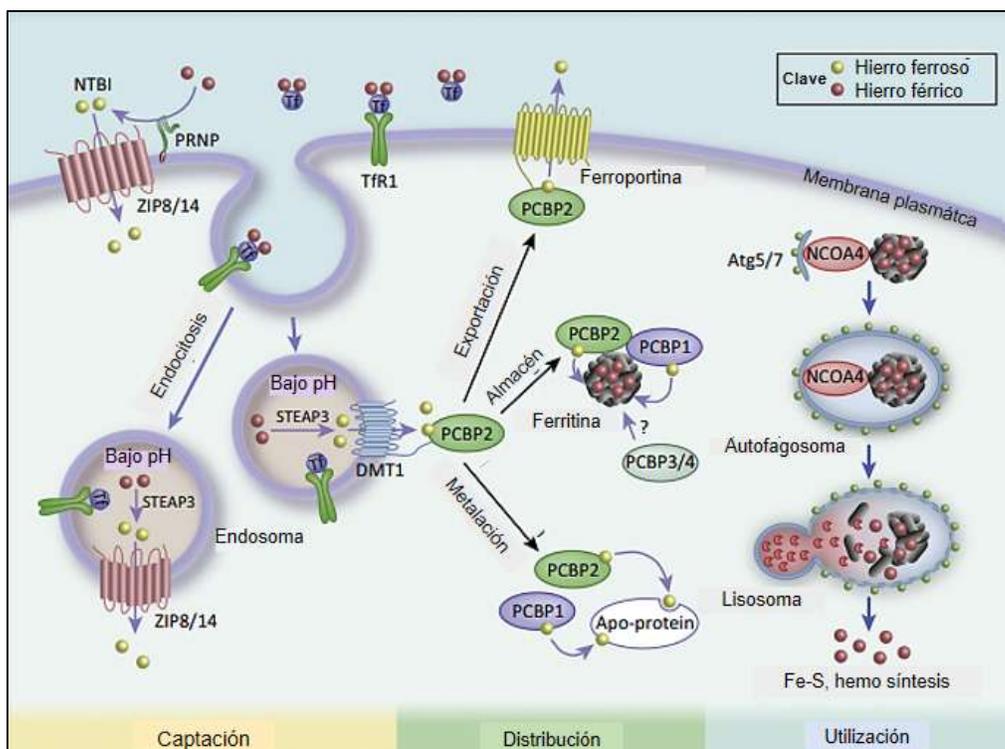
El hierro es un compuesto metálico de transición que se ve envuelto en múltiples procesos fisiológicos. Se encuentra repartido en los eritrocitos (50%), el hígado (25%), los macrófagos-bazo (15%), y los músculos (10%) (Rivella & Crielaard, 2014). Interviene en varios procesos como el transporte de oxígeno (hemoglobina), producción de energía en la cadena de transporte de electrones, síntesis y reparación de ácidos nucleicos (primasa de DNA, ribonucleótido reductasa), metabolismo de xenobióticos, etc. (Dev & Babitt, 2017).

De forma general, la regulación del hierro a nivel celular está mediado por las proteínas de internalización, almacenaje y excreción del hierro. El hierro férrico puede ser captado por la proteína transferrina (Tf) e internalizarse por endocitosis tras la unión al receptor de transferrina 1 (TfR1), o el hierro férrico puede pasar a hierro ferrosos y ser captado por la familia de transportadores SLC39/ZIP. El hierro luego puede ser inactivado y almacenado por la ferritina, o ser excretado por la bomba de flujo ferroportina (Fpn), donde la hormona, hepcidina, regula la degradación de la ferroportina en dependencia de los niveles de hierro (Figura 3). El hierro también actúa como un mediador de muerte celular dependiente de la producción de especies reactivas de

oxígeno (ROS), como en la ferroptosis, o independiente de ROS en la facilitación de la apoptosis (descritos más adelante) (Bogdan, Miyazawa, Hashimoto, & Tsuji, 2016).

Figura 3

Mecanismos de regulación del metabolismo del hierro intracelular



Nota: Captación de hierro en forma de hierro ferroso por la familia de transportadores SLC39/ZIP (ZIP8/14, NTBI), o por la internalización del hierro férrico mediante el receptor de transferrina 1 (TfR1). El hierro luego es utilizado por apo-proteínas, almacenado por la ferritina o exportado mediante la ferroportina (Fpn). Para su uso posterior, el hierro es liberado por autofagia, con ayuda del por el receptor coactivador nuclear (NCOA4). Modificado de Bogdan, Miyazawa, Hashimoto & Tsuji (2016).

Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es una condición celular que conlleva la pérdida del balance redox debido a que las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) u otros oxidantes se hallan en una proporción que es insostenible para los mecanismos antioxidantes de la célula (Galluzzi et al., 2015). Las ROS junto con otros radicales se producen de manera natural en el metabolismo celular, donde juegan el papel de segundos mensajeros y en la eliminación de patógenos por agentes fagocitarios. Pero una vez sobrepasado el nivel normal celular, las ROS pueden convertirse en un agente oxidante y causar daños irreparables en la célula. Las principales especies reactivas de oxígeno son: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y el oxígeno singlete (1O_2) (Pizzino et al., 2017).

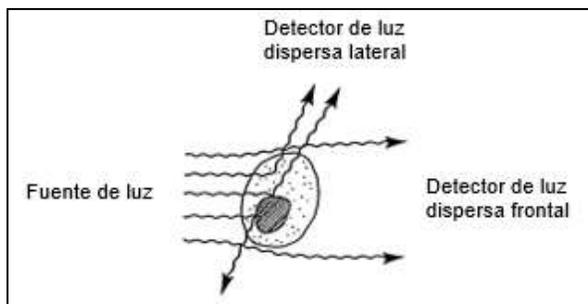
El aumento del nivel de estrés oxidativo en las células está relacionado con varias enfermedades, como Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, artritis, cáncer y muchas otras. En el cáncer se vincula a las ROS en la mutación de DNA o en la inflamación crónica. Los recursos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son esenciales para controlar los niveles de ROS y combatir su aumento. Las fuentes de ROS pueden ser de origen endógeno o exógeno. El exógeno tiene más que ver con la exposición a agentes xenobióticos como toxinas, drogas, alérgenos, metales pesados, etc. Los metales pesados como el hierro, arsénico, cobre pueden desencadenar la producción de ROS por la reacción Fenton (Noda & Wakasugi, 2001; Sharifi-Rad et al., 2020).

Detección de ROS por citometría de flujo

La citometría de flujo se utiliza para evaluar características fisicoquímicas en poblaciones celulares o en poblaciones de partículas suspendidas en un rango de tamaño de 0.2-150 micrómetros. Para ello las células pasan una a una a través de un capilar (en flujo laminar) y son iluminadas con un láser. Las células van a dispersar la luz incidente en diferentes longitudes de onda en dependencia de las diferentes características que presentan. Estas señales llegan finalmente a un foto-detector para ser procesadas por análisis computacional. El citómetro de flujo puede detectar diferencias en intensidad de fluorescencia, granularidad relativa y tamaño relativo de las partículas medidas. La citometría de flujo arroja resultados cuantitativos en muchas aplicaciones en para el uso de citometría de flujo a nivel clínico e investigativo. Entre ellas, el conteo de células, detección de biomarcadores, detección de compuestos, detección de proteínas, microorganismos, etc. (Givan, 2011; Picot, Guerin, Le Van Kim, & Boulanger, 2012). La dispersión de la luz ocurre por el fenómeno de deflexión de la luz que incide sobre las partículas o células. Dos parámetros influyen sobre la totalidad de la luz dispersa. El primero, la luz dispersa frontal, incide sobre la superficie de la célula, por lo que va a dar una medida relativa del tamaño de las partículas. El segundo, la luz dispersa lateral, que corresponde a la luz reflejada o refractada del interior de la célula y de su granularidad (Figura 4) (BD Biosciences, 2002). Existen varios fluoróforos que sirven para cuantificar los ROS producidos a nivel celular. El más usado es la sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína dicacetato (DCFH₂-DA), que permite detectar la cantidad de múltiples ROS (O⁻, H₂O₂, OH⁻ y NO). Mientras, el MitoROS 580 y el dihidroetidio, miden solo el superóxido generado. El Nitrixyte Orange puede medir el óxido nítrico (Luo et al., 2016).

Figura 4

Modelo de dispersión de la luz en citometría de flujo



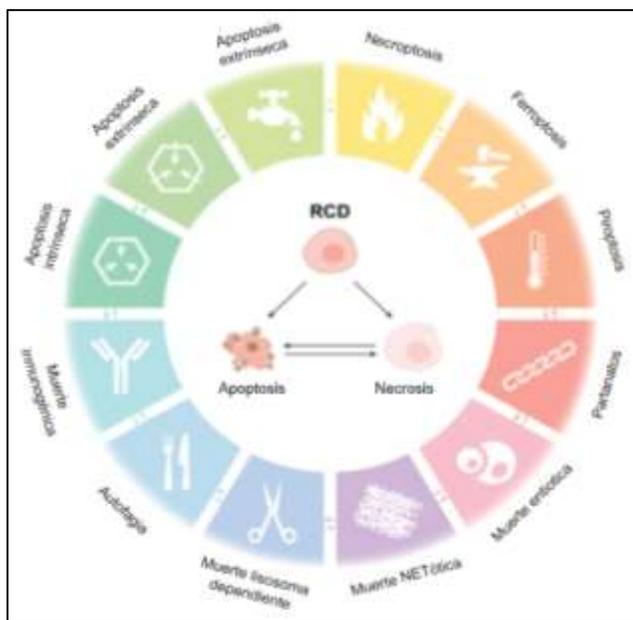
Nota: La luz dispersa lateral se refleja aproximadamente a 90 grados

Muerte celular

El comité de la nomenclatura en muerte celular (NCCD) menciona que la muerte celular se da cuando hay un daño irreparable en la membrana celular. La muerte celular se puede generar de forma accidental (ACD, por sus siglas en inglés) o de manera regulada (RCD, por sus siglas en inglés). Un tipo de ACD corresponde a la necrosis, donde el estrés físico, químico o mecánico provocan la muerte repentina de la célula. Mientras la PCD, se da luego de la pérdida de la homeóstasis celular y debido a que la célula no puede recuperar el equilibrio por ningún medio (Tang, Kang, Berghe, Vandenabeele, & Kroemer, 2019). Los tipos de RCD se clasifican en dependencia de sus diferencias morfológicas y moleculares: la apoptosis, la autofagia, ferroptosis, piroptosis, etc. (Figura 5) (Galluzzi et al., 2018).

Figura 5

Clasificación de los tipos de muerte celular regulada



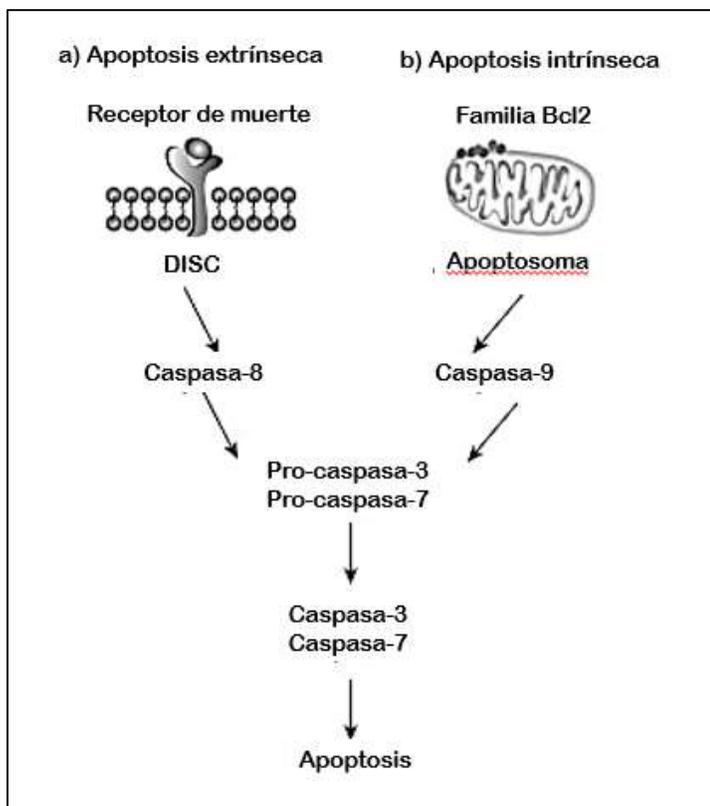
Nota: Rutas de muerte celular regulada (RCD). Modificado de Galluzzi et. al (2018).

Apoptosis

En la apoptosis es un mecanismo dependiente de energía, donde la célula presenta una morfología característica, con la condensación del núcleo, el encogimiento de la célula, el rompimiento de la membrana y el ADN celular y formación de cuerpos apoptóticos, que *in vivo* normalmente son fagocitados (Kim-Campbell, Gomez, & Bayir, 2019). La apoptosis puede ser iniciada por factores extracelulares, que promueven la formación del complejo de señalización de inducción de muerte (DISC), o intracelulares, como el desbalance redox y estrés oxidativo (McIlwain, Berger, & Mak, 2013). En la apoptosis promovida en el interior celular, la formación del apoptosoma está mediado por la familia de proteínas BCL2 (Figura 6). Ambos mecanismos conllevan a la activación de la ruta de las caspasas -3 y -7 y la subsecuente RCD (Navarro & Salvesen, 2016).

Figura 6

Rutas de activación de muerte celular por apoptosis



Nota: (a) Apoptosis extrínseca o extracelular, el complejo de señalización para la inducción de muerte (DISC) moviliza la acción de la caspasa-8 (b) Apoptosis intracelular, la familia Bcl2 controla la formación del apoptosoma que activa la caspasa-9. Ambas rutas desencadenan las caspasas -3 y -7. Modificado de Navarro & Salvesen (2016).

Necrosis

La necrosis trata de un mecanismo de muerte celular que no está regulado (ACD), generalmente inducido por un daño externo. Requiere de la activación de compuestos y proteínas pro-inflamatorias como el factor nuclear κB (NF- κB) que desemboca en la lisis celular y el derramamiento de los componentes celulares en las áreas circundantes, dando lugar a una respuesta inflamatoria y daño de tejidos.

Mientras la apoptosis es un proceso de muerte celular que requiere de energía, la necrosis es un proceso espontáneo que puede ser causado por un daño tan severo que imposibilite a la célula de seguir funcionando por ejemplo daño por falta de oxígeno, presencia de especies químicas, radiación o calor entre otras causas. La necrosis también es la consecuencia de un proceso conocido como oncosis, que consiste en el hinchamiento de la célula y de sus organelos, debido a que esta ya no es capaz de mantener la homeostasis con su medio circundante. Puede suceder que una célula dañada de inicio a un proceso de apoptosis con el respectivo consumo de ATP, pero no tenga la suficiente energía para terminar el proceso; en ese caso se desencadena un proceso de oncosis y finalmente la muerte de la célula por necrosis (D'Arcy, 2019).

Autofagia

La autofagia es un proceso de muerte celular en el que se usan lisosomas para degradar los organelos o componentes celulares como macro proteínas dentro de la célula. Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas capaces de digerir estos sustratos, y los componentes resultantes pueden ser reciclados para la construcción de otras estructuras o pueden ser utilizados como fuente de energía. El mecanismo de autofagia también está involucrado en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, proceso en el que degrada patógenos intracelulares, presenta antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II e inicia el transporte de material genético viral hacia los receptores TLR. Aunque la autofagia es comúnmente utilizada por las células para el reciclaje de sus componentes, también puede terminar en la destrucción de la célula y puede ser utilizada para la reparación de lesiones neoplásticas o la eliminación de células senescentes. Fallas en el proceso de autofagia pueden devenir en cáncer o enfermedades como Alzheimer, consecuencia de la generación de agregados proteicos (D'Arcy, 2019).

Existen tres mecanismos descritos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y autofagia selectiva. En los procesos de macroautofagia, se engloban sectores enteros de la célula dentro de vesículas de doble membrana llamados autofagosomas. Estos autofagosomas se unen con lisosomas formando autofagolisosomas donde las enzimas hidrolíticas actúan. La microautofagia se trata de un proceso más específico, en el que los componentes a ser degradados interactúan y se fusionan directamente con los lisosomas. La microautofagia puede ser desencadenada por señales moleculares en la membrana de organelos dañados. Finalmente, la autofagia selectiva o también llamada autofagia mediada por chaperonas, es un proceso en el que los péptidos a degradarse se unen a proteínas chaperonas, que sirven como señal molecular para la interacción con los lisosomas (D'Arcy, 2019).

Ferroptosis

Se trata de un proceso de muerte celular controlada distinta tanto morfológica como bioquímica y genéticamente de los procesos de apoptosis, autofagia o necroptosis. Está estrechamente relacionada al metabolismo del hierro en las células y a la presencia de especies reactivas de oxígeno como peróxidos de lípidos. Morfológicamente se caracteriza por mostrar células redondeadas con mitocondrias más pequeñas de lo normal, con una membrana mitocondrial condensada, una reducción o desaparición de la cresta y la ruptura de la membrana mitocondrial externa y cromatina sin condensar en el núcleo celular (Xie et al., 2016).

Capítulo III: Metodología de la Investigación

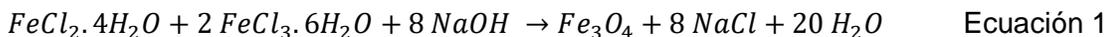
Localización Geográfica y Participantes

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología, bajo la tutela del PhD. Marcelo Grijalva y la Ing. Lizeth Salazar; en conjunto con el Laboratorio de Nanociencia y Nanotecnología, bajo la colaboración del Ing. David Carchi. Laboratorios pertenecientes a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Sangolquí. Ubicación Geográfica: Latitud 0°18'44"S, Longitud 78°26'44"O, Altura elipsoidal 2550 msnm.

Materiales y Métodos

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)

Las nanopartículas (NPs) utilizadas en el presente ensayo fueron sintetizadas en el Laboratorio de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Se sintetizaron NPs de óxido de hierro con cubierta de polietilenglicol (PEG), mediante el proceso de co-precipitación de las sales Fe²⁺ y Fe³⁺ en hidróxido de sodio (NaOH) (Ecuación 1) (McCarthy, Davies, & Gun'ko, 2012).



Para ello se preparó una solución de NaOH 0.5M en 40mL de PEG al 40%. Esta solución se calentó hasta llegar a una temperatura de 40°C. Se preparó también una solución de HCl 0.4M. Todas las soluciones preparadas en sulfito de sodio (Na₂SO₃) 5mM. Luego, se pesaron las sales FeCl₃·6H₂O y FeCl₂·4H₂O en un vaso de precipitación y se añadió la solución de HCl 0.4M, se mezcló durante 15 minutos. A continuación, se añadió la solución de hierro sobre la solución 0.5M de NaOH por goteo,

manteniendo la temperatura a 40°C y agitación constante (el primer rastro de las nanopartículas de óxido de hierro es la formación de un precipitado de color negro). La solución formada se calentó a 80°C por 1 hora, con agitación constante. Luego, se dejó decantar por 30min y se removió con cuidado el sobrenadante. El precipitado se lavó 2 veces más en agua destilada tipo I.

La dispersión de las nanopartículas se realizó por centrifugación a 6000rpm x 18 minutos en tubos de 50 mL. Se tomó el sobrenadante que contenía las NPs dispersas y se almacenó para posterior caracterización. La misma muestra se dispersó hasta por 3 veces y se midió su pH. La caracterización de las NPs se realizó por DLS (Dynamic Light Scattering), XRD (Difracción de Rayos X) y TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión).

Curvas de crecimiento para las líneas de celulares HepG2 e IMR-90

La curva de crecimiento de las líneas de celulares Hep G2 y IMR-90 se estableció con el ensayo de viabilidad celular MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), que reduce el tetrazolio (de color amarillo) a formazán (de color violeta) con ayuda de enzimas oxidorreductasa dependientes de NADPH.

Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares: carcinoma hepático (Hep G2) y fibroblastos de pulmón (IMR-90)

Las líneas celulares Hep G2 e IMR-90 se procesaron de la misma manera. Se partió de un tubo de crio-preservación o criovial que se encontraba almacenado en nitrógeno líquido. A continuación, se descongeló cada criovial, en un calentador de líquidos (Mettler WNB 14) a 37°C y se transfirió su contenido a un tubo falcon con 9 mL de medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium) suplementado (10% de SFB

y 1% de antibiótico Pen/Strep). El tubo se llevó a centrifugación a 130 x g por 7 minutos para la línea celular Hep G2 y por 10 minutos para la IMR-90. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo. Luego se realizó un conteo del número de células con una cámara de Neubauer y se transfirió el contenido del tubo a un flask de 25 cm² con 4 mL de medio de cultivo MEM suplementado. El flask se mantuvo en la incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Se monitoreó el crecimiento celular por medio del microscopio invertido (Nikon Eclipse Ts2R-FL). El cambio de medio de cultivo se realizó cada 2 y 3 días para la línea celular Hep G2 e IMR-90, respectivamente.

Una vez observada una confluencia del 80-90% se pasó el contenido del flask a uno de mayor tamaño 75 cm² o dos flask dependiendo el caso. Para ello se retiró el medio de cultivo del flask inicial, se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar todo residuo de medio de cultivo y se procedió a colocar la solución 0.25% Tripsina-EDTA hasta que cubriera toda el área superficial. El cultivo con la solución enzimática se incubó a 37°C de 2-3 minutos hasta observar en el microscopio que las células se encuentren despegadas (con forma redondeada y flotando en el medio). Para detener la reacción se colocó medio de cultivo MEM suplementado (3 veces más que la cantidad de tripsina añadida). Se aspiró el contenido del flask, se lo colocó en un tubo falcon con 9 mL de medio de cultivo y se lo llevó a centrifugación a 130 x g. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1 mL de medio MEM suplementado y se colocó su contenido en el o los nuevos flasks.

Con estos procedimientos se realizó un stock de la línea celular Hep G2 e IMPR-90 por separado, obteniendo una cantidad suficiente de células para los experimentos posteriores. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido, en tubos de crio-

congelación con medio de congelamiento preparado en proporción 2:1:1 de medio MEM, SFB y DMSO.

Ensayo MTT con las líneas celulares Hep G2 e IMR-90

Para definir la curva de crecimiento de cada línea celular se realizó el ensayo de proliferación celular con el Kit Vybrant MTT Cell Proliferation Assay (Invitrogen). Para ello se preparó una solución madre de MTT 12 mM agregando 1 mL de PBS por cada 5 mg de MTT (componente 1). El contenido se homogenizó por vórtice hasta su disolución. La solución preparada de MTT se almacenó hasta por cuatro semanas a 4°C protegida de la luz. Por separado se agregó 10 mL de HCl 0.01 M a un frasco que contenía 1g de dodecilsulfato sódico o SDS (componente 2). Se mezcló la solución suavemente por inversión hasta que el SDS se disolvió completamente.

Se utilizaron 3 concentraciones diferentes de células (5000, 7500 y 10000) cultivadas por pocillo en placas de 96 pocillos, con 6 repeticiones de cada una y un control negativo o blanco. El protocolo se realizó en 5 y 8 días para las líneas celulares Hep G2 e IMR-90, respectivamente, bajo el procedimiento descrito a continuación.

El medio de cultivo se reemplazó con 100 µL de medio de cultivo fresco sin rojo fenol. Se agregó 10 µL del componente A (solución 12mM MTT) a cada pozo. El blanco contenía 100 µl de medio de cultivo sin rojo fenol y 10 µL del componente 1. Se dejó en incubación la placa a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Luego se agregaron 100 µL del componente 2 (solución de SDS-HCl) a cada pocillo, homogenizando con la micropipeta. Se incubó la microplaca a 37°C durante 17 horas en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Se homogenizó el contenido de la microplaca y se leyeron las absorbancias de las muestras a 570 nm en un lector de placas. La toma de datos se realizó cada 24 horas.

Estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄) en condiciones de cultivo celular

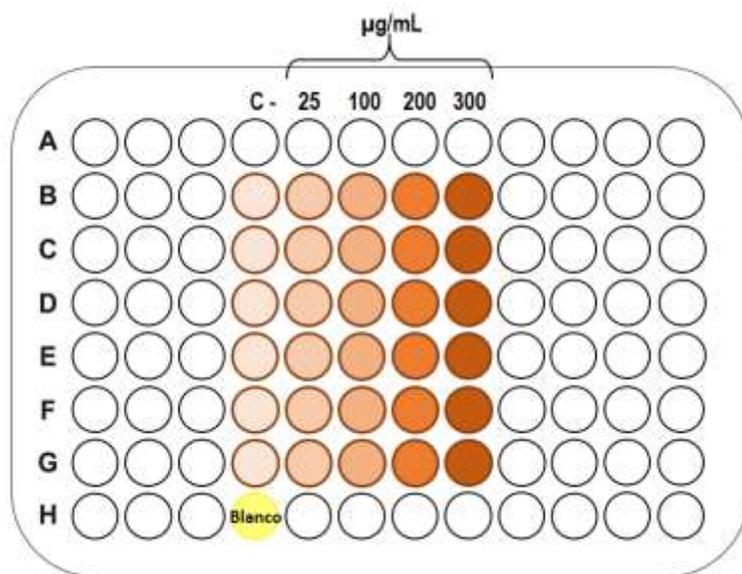
Se verificó la estabilidad de las NPs de Fe₃O₄ a las concentraciones de 100ug/mL y 300ug/mL en condiciones de cultivo celular. Para ello, las NPs se diluyeron en medio de cultivo suplementado (10% de SFB y 1% Pen/Strep), se colocaron en cajas Petri y se dejaron en la incubadora en condiciones de cultivo celular (37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad) durante 3 días. Se realizaron tres réplicas de las diluciones por día y se midió su tamaño por DLS a las 24, 48 y 72 horas.

Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante el ensayo MTT, anteriormente descrito. Se probaron las concentraciones de 25, 100, 200 y 300 µg/mL de NPs con 6 repeticiones tanto para las concentraciones de NPs como para el control negativo (células sin exposición) (Figura 7). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Para la línea celular IMR-90, se sembraron 10 000 células/pocillo y se dejaron en incubación (37°C y 5% de CO₂) por 48 horas para aplicar las distintas concentraciones de NPs de Fe₃O₄. En cambio, con la línea celular Hep G2 se sembraron 6 000 células/pocillo de dejó en incubación (37°C y 5% de CO₂) por 24 horas y se aplicaron las NPs de Fe₃O₄. Las absorbancias se tomaron en un lector de placas de 96 pocillos a las 24, 48 y 72 horas a una temperatura de 37°C y longitud de onda 570nm.

Figura 7

Distribución del ensayo de viabilidad celular a distintas concentraciones de NPs



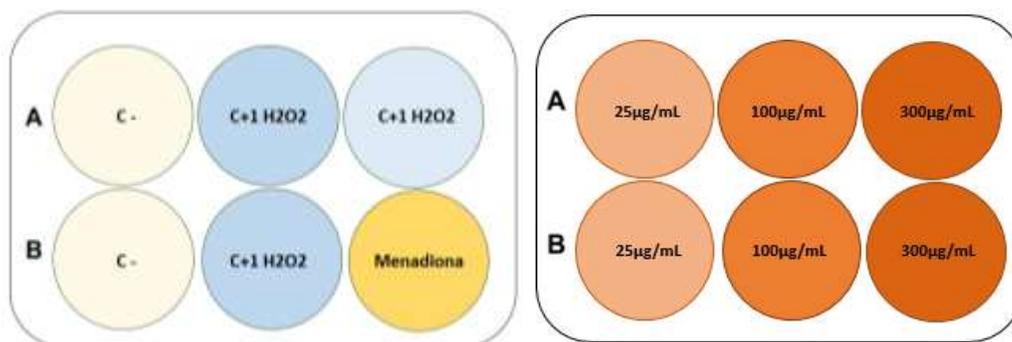
Nota: Se realizaron 6 repeticiones de cada concentración (25, 100, 200 y 300 µg/mL) y del control negativo.

Ensayo de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se evaluó con ayuda del Muse Oxidative Stress Kit (Luminex), que cuantifica el nivel de ROS, específicamente el nivel de radical superóxido (O^-) celular, en el equipo Guava Muse Cell Analyzer (Luminex). Se cultivaron las líneas celulares en platos de 6 pocillos, con DS0 de: 150 000 y 180 000 células/ pocillo para Hep G2 e IMR-90, respectivamente, y se las llevó a incubación a 37°C, 5% de CO_2 y 90% de humedad. A continuación, se colocaron las nanopartículas (NPs) de Fe_3O_4 en concentraciones de 25, 100 y 300 µg/mL. Los controles positivos fueron menadiona (200ug/mL en Hep G2 y 100 ug/mL en IMR-90) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (5-3mM en Hep G2 y 1-2mM en IMR-90) por 3 horas de exposición (Figura 8).

Figura 8

Distribución del ensayo de estrés oxidativo a distintas concentraciones de NPs



Nota: Se realizaron 2 repeticiones de cada concentración (25, 100 y 300 µg/mL) y del control negativo. C- corresponde al control negativo sin exposición, C+1 y C+2 para la línea celular Hep G2 corresponden a 3 y 5mM y para la línea celular IMR-90 a 1 y 2mM, respectivamente.

Para la preparación de las muestras se levantaron las células de los tratamientos y controles con 0.25% Tripsina-EDTA y se diluyeron en el buffer de ensayo 1X para que lleguen a una concentración entre 1×10^6 y 1×10^7 células/pocillo. Para la tinción, se preparó la solución de tinción haciendo una dilución intermedia del reactivo de tinción en el buffer de ensayo 1X en proporción 1:100, seguido de una dilución 1:80 de la dilución intermedia nuevamente en buffer de ensayo 1X. Luego se tomaron 10 µL de la muestra diluida en buffer, se colocaron en un tubo de 1.5mL y se añadieron 190 µL de la solución de tinción preparada. Las muestras se llevaron a incubación a 37°C por 30 minutos, luego de los cuales se homogenizaron por vórtex y se leyeron individualmente. Las mediciones se tomaron a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las NPs.

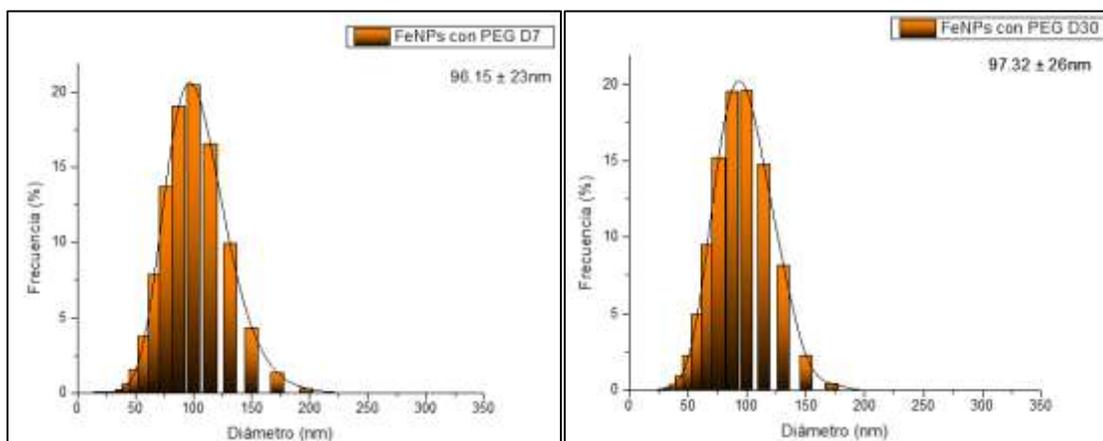
Capítulo IV: Resultados

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4)

Se midió el diámetro hidrodinámico de las NPs de Fe_3O_4 con y sin PEG al 40% por DLS (Horiba LB500). Se encontró una distribución normal de los datos de frecuencia a los 7 y 30 días (Figura 9 y Figura 10). Se probó su la estabilidad a día seguido desde el día 1 al día 7 y después se hicieron las mediciones en el día 15, 22 y 30. La Figura 11 muestra que el diámetro hidrodinámico las nanopartículas con la cubierta de PEG 40% se mantuvo en un promedio de 99.289 ± 8.27 nm hasta los 30 días, mientras que las NPs sin la cobertura PEG aumentan su diámetro hidrodinámico a los 15 días, 22 y 30 días, llegando al valor promedio 180.16 ± 26.6 nm.

Figura 9

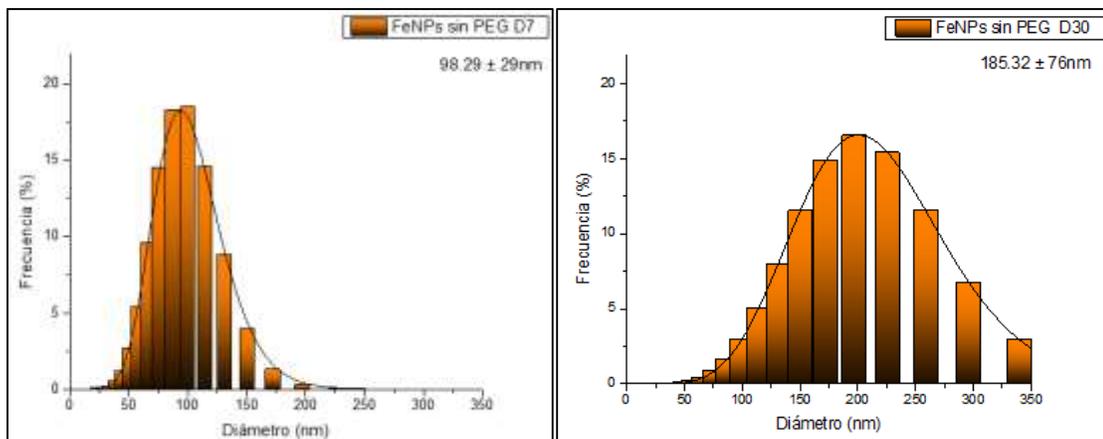
Distribución de frecuencia de diámetro hidrodinámico de las FeNPs con PEG40



Nota: A la izquierda la distribución de frecuencia de las FeNPs con PEG al 40% a los 7 días de síntesis, a la derecha a los 30 días después de su síntesis. Los dos gráficos siguen una distribución Gaussiana.

Figura 10

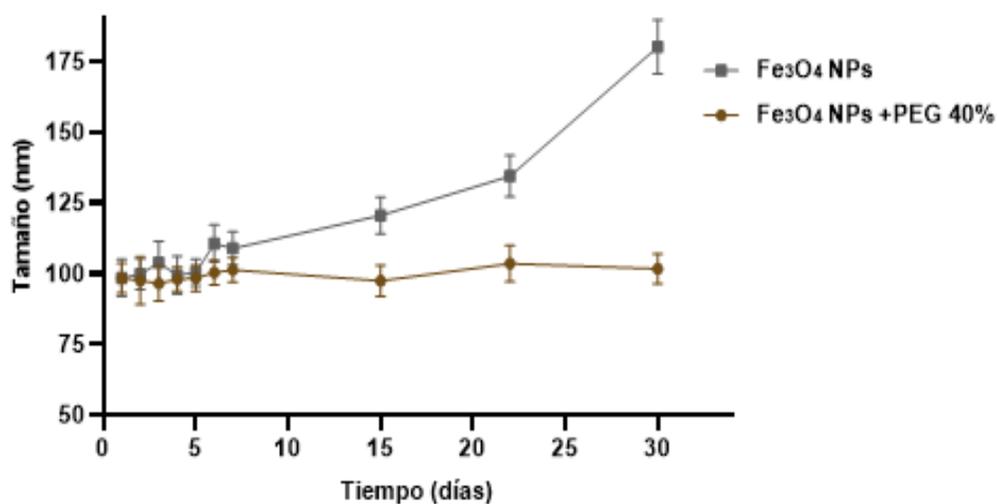
Distribución de frecuencia de diámetro hidrodinámico de las FeNPs sin PEG40



Nota: A la izquierda la distribución de frecuencia de las FeNPs sin PEG al 40% a los 7 días de síntesis, a la derecha a los 30 días después de su síntesis. Los dos gráficos siguen una distribución Gaussiana.

Figura 11

Diámetro hidrodinámico de nanopartículas de Fe_3O_4 medidas en el tiempo por DLS

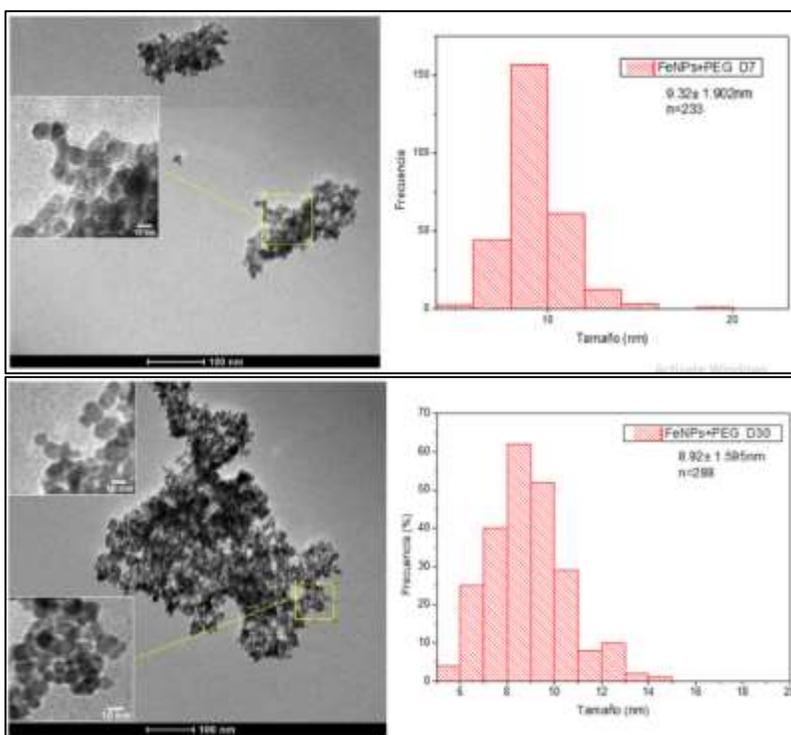


Nota: FeNPs + PEG y FeNPs sin PEG se refiere a las NPs de Fe_3O_4 con y sin cobertura de PEG al 40%, respectivamente.

Las imágenes obtenidas por el equipo TEM (FEI, Spirit Twin) muestran agregados de las NPs con un tamaño individual de 9.32 ± 1.902 nm a los 7 días y de 8.92 ± 1.595 nm para las NPs de Fe_3O_4 con PEG al 40% (Figura 13). Por otro lado, las NPs de Fe_3O_4 manifiestan tamaños de 7.90 ± 1.495 y 8.45 ± 1.325 nm a los 7 y 30 días, respectivamente (Figura 13).

Figura 12

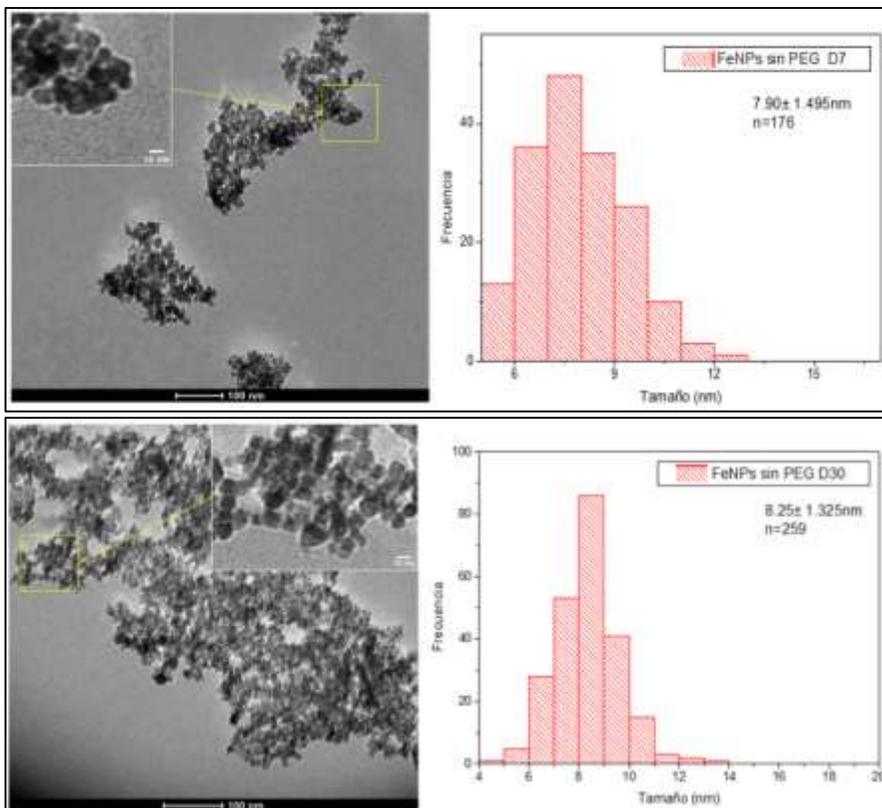
Imágenes en TEM de las nanopartículas de Fe_3O_4 con cobertura PEG a los 7 y 30 días



Nota: FeNPs + PEG D7 y D30 corresponden a los 7 y 30 días, respectivamente.

Figura 13

Imágenes en TEM de las nanopartículas de Fe_3O_4 descubiertas a los 7 y 30 días



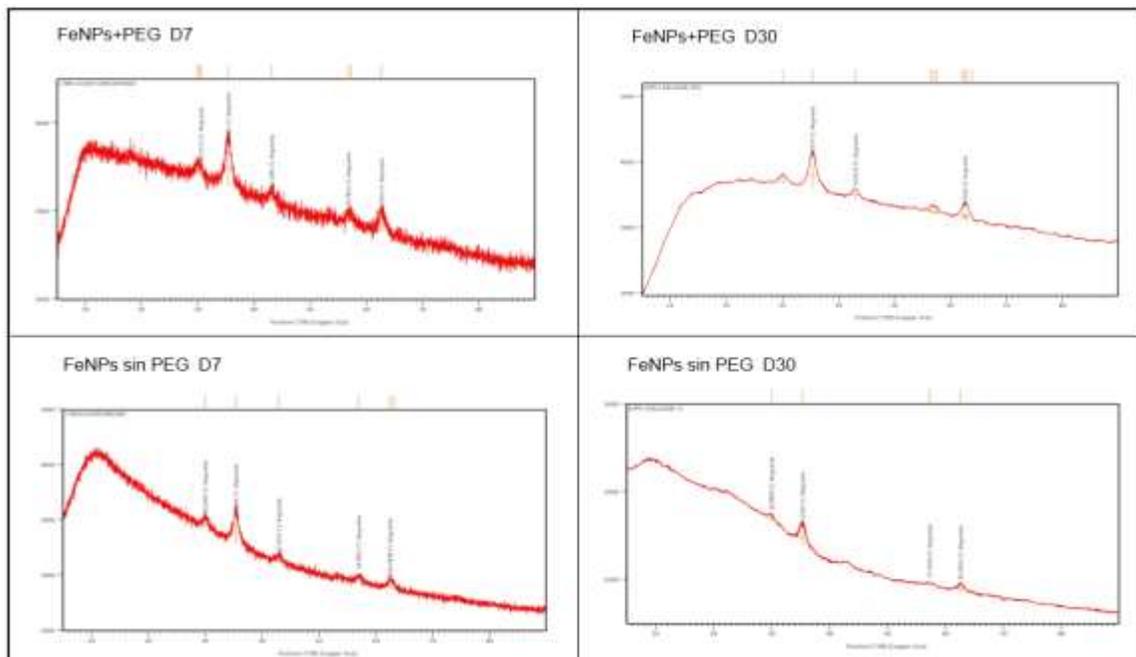
Nota: FeNPs sin PEG D7 y D30 corresponden a nanopartículas de Fe_3O_4 descubiertas los 7 y 30 días, respectivamente.

Finalmente, los análisis de las NPs en el difractómetro de rayos X (XRD PANatycal Empeyrean) mostraron 5 picos anchos (220, 311, 400, 422, 511 y 440) correspondientes a la magnetita (Fe_3O_4) a los 7 y 30 días para las NPs con cubierta PEG. Las NPs sin cubierta PEG tuvieron los picos Se observan los picos los 5 picos de la magnetita a los 7 días, pero a los 30 días solo se evidenciaron 4 picos correspondientes a la magnetita (Figura 16). El procesamiento de datos en el software OriginPro 9 se muestra para las NPs con y sin cubierta a los 30 días después de su síntesis, debido a que presentaron menor ruido. Al comparar con el estándar de

magnetita, se observa en los datos analizados la presencia de todos los picos en las NPs con cubierta PEG, pero las NPs sin cubierta no mostraron el pico en 422, si no en 421 (Figura 15 y Figura 16).

Figura 14

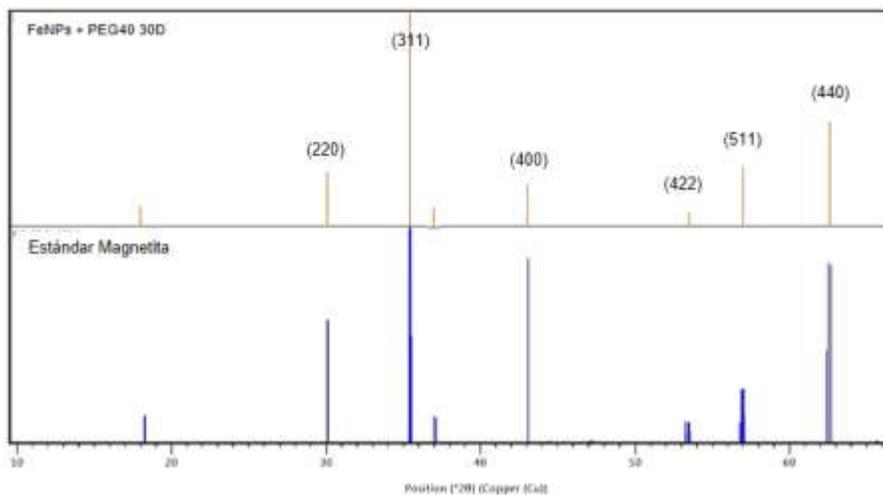
Resultados de XRD de las nanopartículas de Fe_3O_4 con y sin PEG a los 7 y 30 días



Nota: FeNPs+PEG y FeNPs sin PEG se refiere a las NPs de Fe_3O_4 con y sin cobertura de PEG al 40%, respectivamente a los 7 y 30 días de síntesis (D7 y D30).

Figura 15

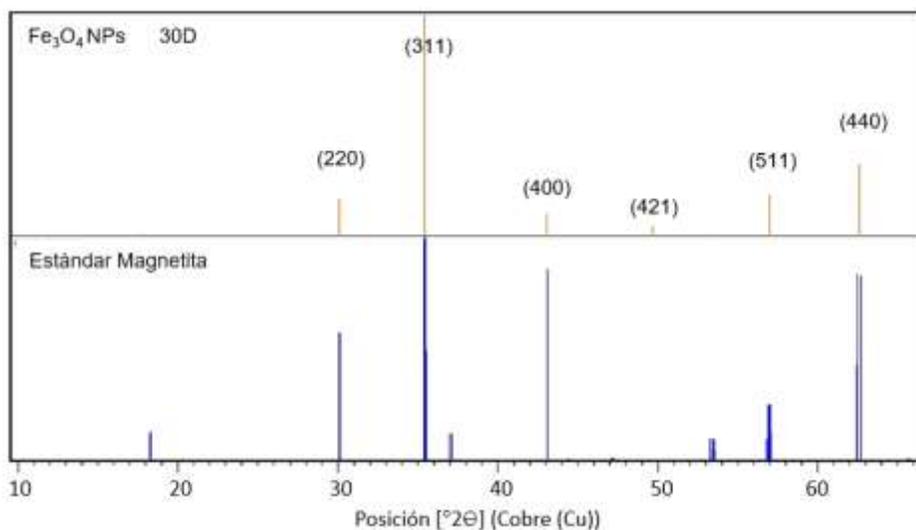
Resultados analizados de XRD de las nanopartículas de Fe_3O_4 con PEG a los 30 días



Nota: FeNPs+PEG y FeNPs sin PEG se refiere a las NPs de Fe_3O_4 con y sin cobertura de PEG al 40%, respectivamente a los 7 y 30 días de síntesis (D7 y D30).

Figura 16

Resultados analizados de XRD de las nanopartículas de Fe_3O_4 sin PEG a los 30 días



Nota: FeNPs+PEG y FeNPs sin PEG se refiere a las NPs de Fe_3O_4 con y sin cobertura de PEG al 40%, respectivamente a los 7 y 30 días de síntesis (D7 y D30).

Estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) en condiciones de cultivo celular

Se verificó la estabilidad de las NPs de Fe_3O_4 mediante la medición del tamaño en el DLS en condiciones de cultivo celular en el tiempo. Se utilizaron NPs al día 15 de síntesis. La tabla 1 describe los tamaños encontrados a las 24, 48 y 72 horas. Las nanopartículas con cubierta PEG al 40% tuvieron un tamaño promedio en los 3 días de exposición de $144.96 \pm 2.03 \text{ nm}$ y las NPs sin cubierta de $164.24 \pm 5.32 \text{ nm}$.

Tabla 1

Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Fe_3O_4 medidas en el tiempo por DLS

FeNPs	24 horas		48 horas		72 horas	
	Repeticiones	Promedio	Repeticiones	Promedio	Repeticiones	Promedio
Con cubierta (Peg 40%)	144.5±34.2nm	143.3 ±4.03nm	148.8±31.8nm	145.4 ±3.33nm	145.7±30.2nm	146.2 ±3.65nm
	147.0±50.3nm		143.6±45.3nm		142.4±47.1nm	
	139.5±47.1nm		145.6±58.9nm		149.1±34.9nm	
Sin cubierta	162.3±45.2nm	161.4 ±1.23nm	165.5±46.1nm	164.6 ±5.41nm	174.3±88.7nm	171.73 ±3.15nm
	159.3±43.7nm		169.0±45.2nm		167.6±65.2nm	
	161.8±46.8nm		160.3±38.9nm		173.3±67.3nm	

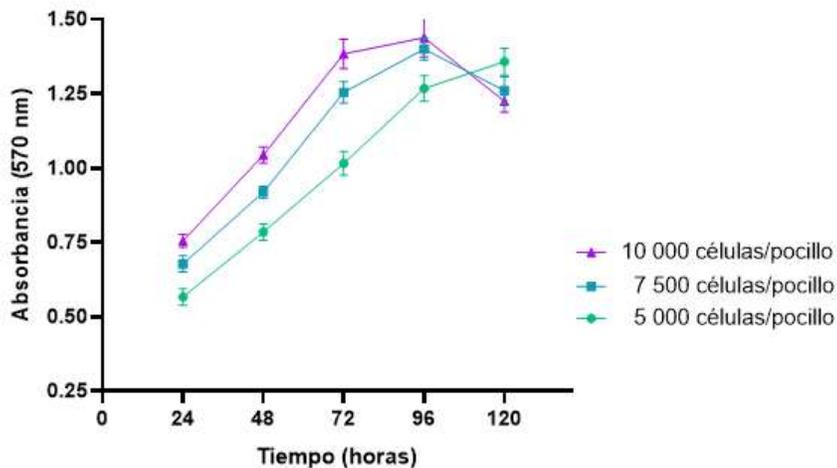
Nota: FeNPs se refiere a las nanopartículas de Fe_3O_4 .

Curvas de crecimiento para las líneas de celulares Hep G2 e IMR-90

Se analizó el crecimiento de las dos líneas celulares en base a la densidad de siembra (DS_0). Para las dos líneas celulares se graficaron las absorbancias, obtenidas en el ensayo MTT, en función del tiempo (Figura 17 y Figura 21). Para DS_0 analizó el modelo de regresión no lineal (GraphPad Prims 8) y se obtuvo un ajuste de crecimiento exponencial para las dos líneas celulares, con sus respectivas ecuaciones (Figura 18 Figura 22). Luego, se verificó la linealidad en la zona de crecimiento exponencial. Las regresiones lineales encontradas tuvieron un promedio de $R^2= 0.987$ y $R^2=0.989$ para la línea celular Hep G2 e IMR-90, respectivamente (Figura 19 y 24).

Figura 17

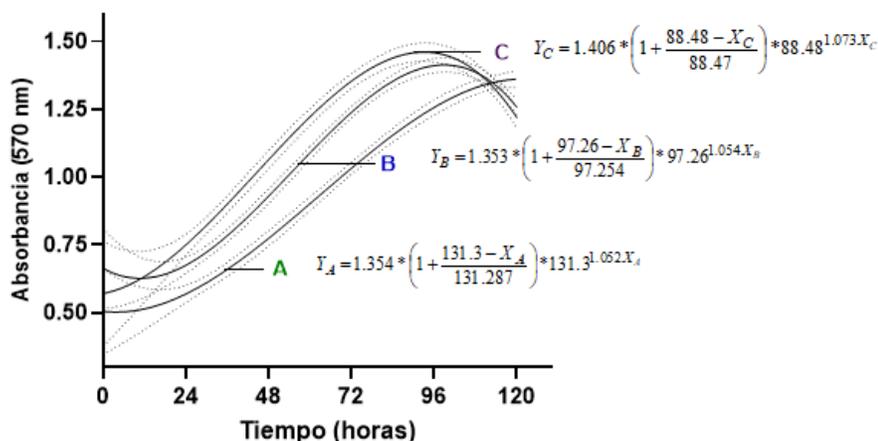
Crecimiento de la línea celular Hep G2 a distintas densidades de siembra



Nota: Los valores de 1000, 7500 y 5000 corresponden a las DS_0 .

Figura 18

Modelo del crecimiento de la línea celular Hep G2 a distintas densidades de siembra

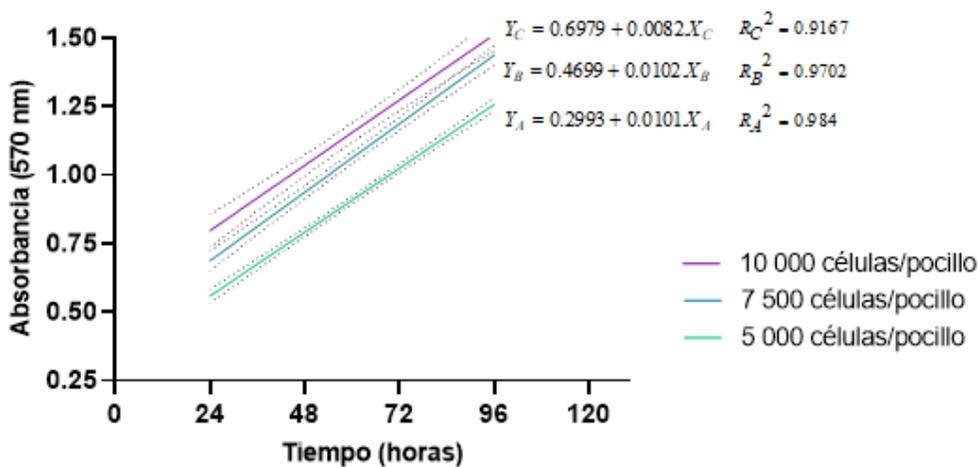


Nota: La curva de crecimiento A corresponde a la DS₀ de 5000 células/pocillo, la B a la DS₀ de 7500 células/pocillo y la C la DS₀ de 10000 células/pocillo. Las líneas entrecortadas corresponden a los intervalos de confianza de cada curva.

Para la línea celular Hep G2 el modelamiento se realizó mediante la ecuación de crecimiento exponencial: beta crecimiento y decline al final de la curva (GraphPad Prims 8) como se observa para las tres DS₀. Al inicio de la curva se observa que no existe una diferencia en las absorbancias para las DS₀ 10 000 y 7 500 (cruce de curvas B y C Figura 18). Para estas dos DS₀ el crecimiento exponencial inicia a las 24 h llega hasta las 72 h, pasando luego a la fase meseta a las 96 h y decaimiento a las 120 h. Mientras que, para la DS₀ 5 000 la fase exponencial se extendió hasta las 96h (curva A Figura 19). Las regresiones lineales evidenciaron mejor linealidad para la DS₀ 5 000 en el intervalo de 24 - 96 h ($R^2=0.84$), y para la DS₀ 10 000 y 7 500 en el intervalo de 24-72 h (Figura 20).

Figura 19

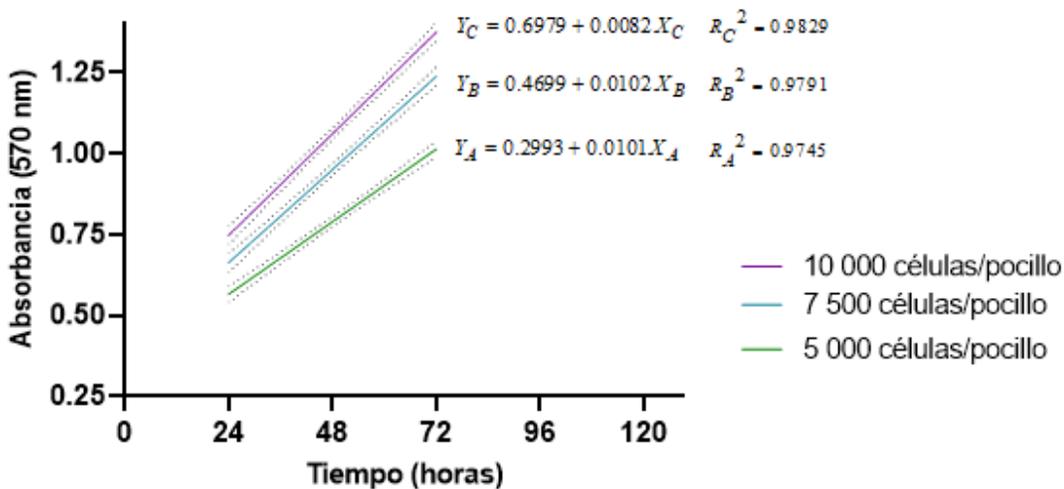
Zona lineal de curvas del crecimiento de la línea celular Hep G2 de 24 a 96 horas.



Nota: Los valores de 1000, 7500 y 5000 corresponden a las DS_0 .

Figura 20

Zona lineal de curvas del crecimiento-línea celular Hep G2 de 48 a 96 h

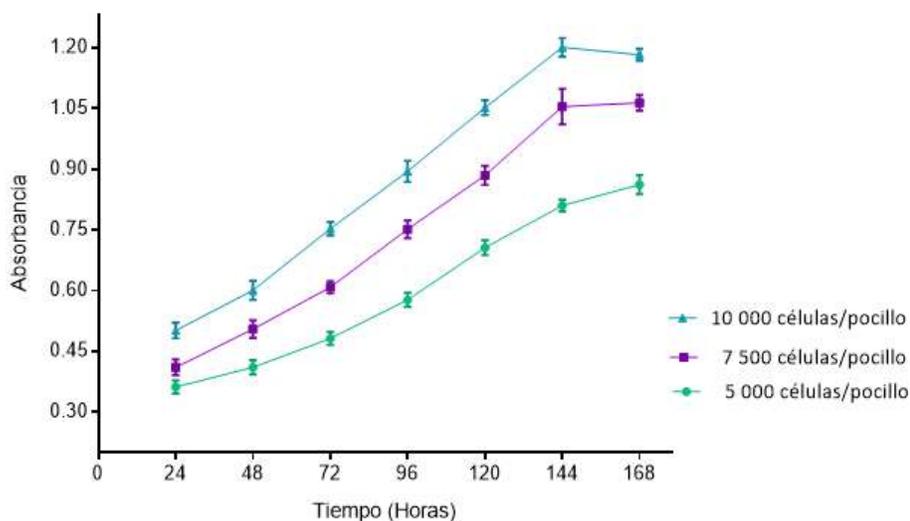


Nota: Los valores de 1000, 7500 y 5000 corresponden a las DS_0 .

Para la línea celular IMR-90 el modelamiento se realizó mediante la ecuación de crecimiento exponencial logística (GraphPad Prims 8) para las DS_0 10 000, 7 500 y 5 000 (Figura 22). Al inicio de las curvas no se observa una diferencia en las absorbancias para las DS_0 10 000, 7 500 y 5 000 (cruce de las bandas de confianza para las curvas A, B y C Figura 23). La fase de crecimiento exponencial es más dilatada en el tiempo para las tres DS_0 que para la línea celular Hep G2, con una duración de 168 vs 96h. Según el modelo escogido la curva no presenta fase meseta para ninguna DS_0 , en el intervalo de tiempo del ensayo. La zona lineal de las curvas se ajustó mejor a la región comprendida entre las 72 y 144h (Figura 24) para las tres densidades celulares.

Figura 21

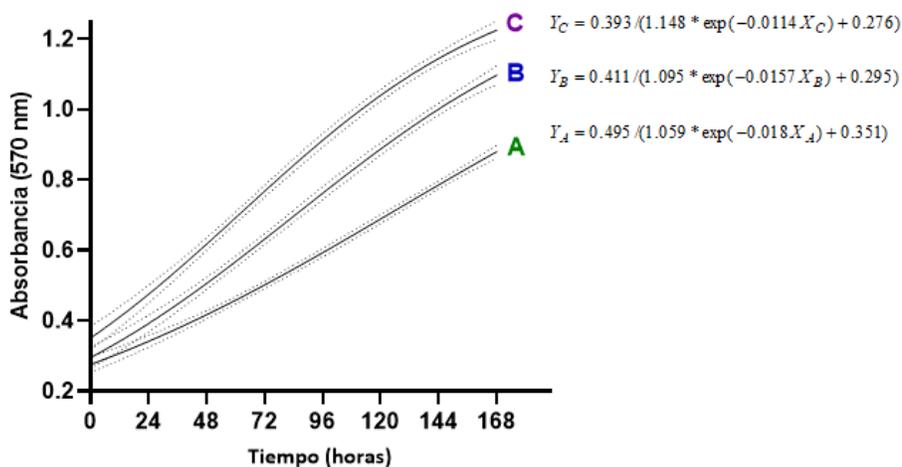
Crecimiento de la línea celular IMR-90 a distintas densidades de siembra



Nota: Los valores de 1000, 7500 y 5000 corresponden a las DS_0 .

Figura 22

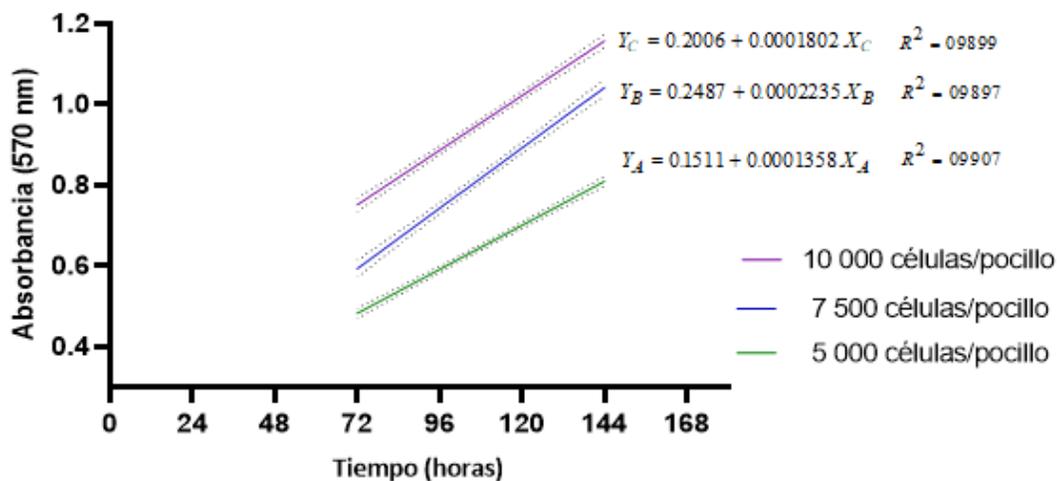
Modelado del crecimiento de la línea celular IMR-90 a distintas densidades de siembra



Nota: La curva de crecimiento A corresponde a la DS_0 de 5000 células/pocillo, la B a la DS_0 de 7500 células/pocillo y la C la DS_0 de 10000 células/pocillo. Las líneas entrecortadas corresponden a los intervalos de confianza de cada curva.

Figura 23

Zona lineal de la curva modeladas crecimiento - línea celular IMR-90 de 72 a 144 horas



Nota: Los valores de 1000, 7500 y 5000 corresponden a las DS_0 .

Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)

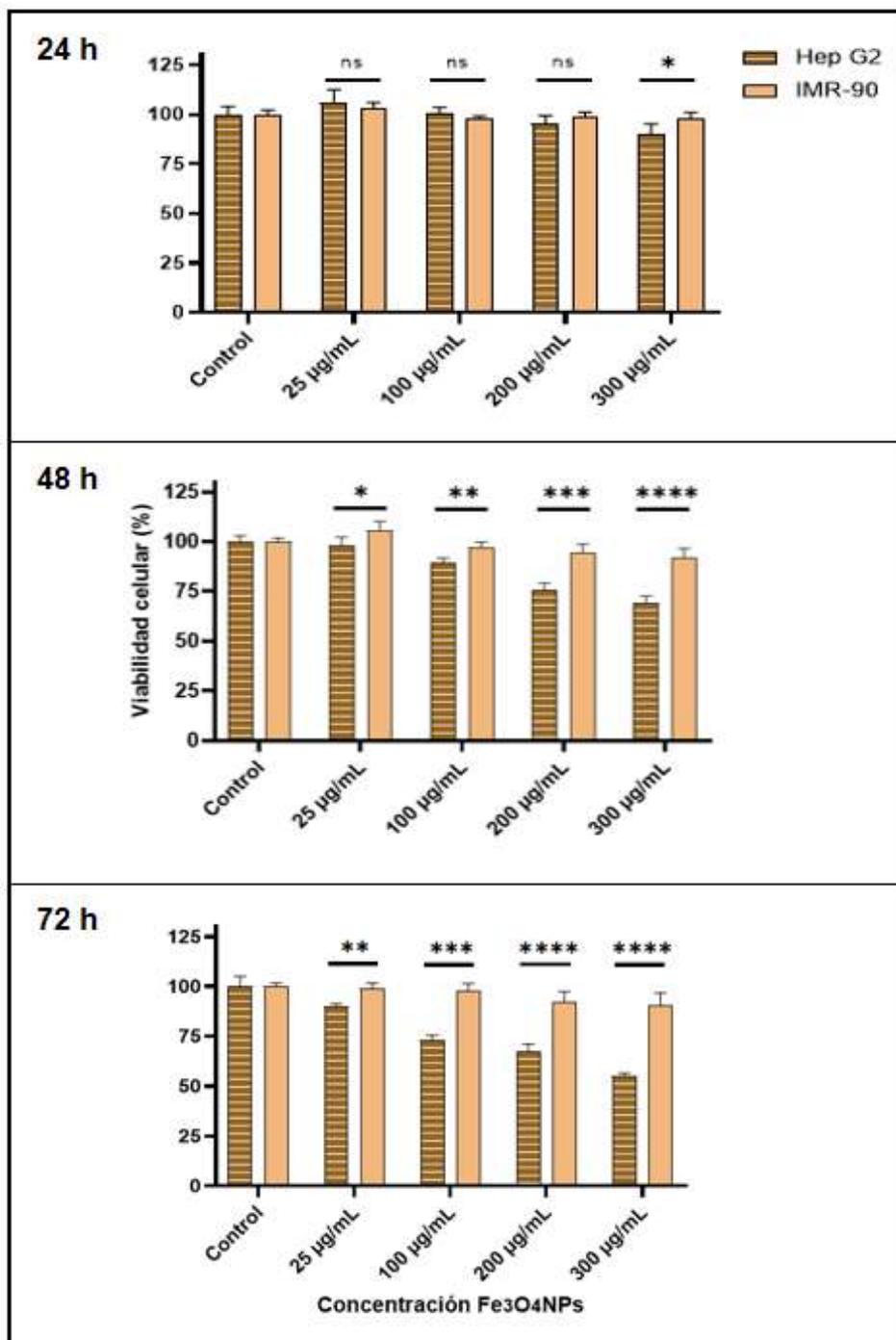
Las líneas celulares se expusieron a diferentes concentraciones de NPs de Fe₃O₄ (25, 100, 200 y 300 µg/mL) y se analizó el % de viabilidad celular a las 24, 48 y 72 h de exposición. Se comparó la viabilidad entre las líneas celulares para cada tratamiento en todos los tiempos. El test ANOVA para el modelo experimental DCA con arreglo factorial 2x3x5 evidenció que existe una diferencia significativa entre las líneas celulares expuestas a las nanopartículas (p_valor<0.001) (Anexos 6-9).

A las 24 h la diferencia solo se visualizó a la concentración más alta (300 µg/mL). A las 48 h se hallaron diferencias a partir de la concentración de 25µg/mL y se notó un aumento en la diferencia con el incremento de la concentración. Lo mismo ocurre a las 72 h de exposición. En todos los casos el % de viabilidad menor lo tuvo la línea celular Hep G2, cabe destacar que a la concentración de NPs más alta y a las 72 horas de exposición el % de viabilidad de las líneas celulares Hep G2 e IMR-90 fueron de 57.31 ± 1.39 y 88.49 ± 3.76 (Figura 24).

La comparación estadística de los tratamientos entre líneas celulares se realizó con el test de Sidak (95% de confianza) para comparaciones múltiples entre las medias con ayuda del software *InfoStat versión 2020* (Tabla 2). A las 24 h solo se encontró diferencia significativa a la concentración de 300µg/mL entre ambas líneas celulares (p_valor=0.0119). Mientras que, a las 48 y 72 h las diferencias se hallaron desde la concentración más baja hasta la más alta con un aumento en la significancia a medida de aumento de la concentración de NPs Fe₃O₄. Estas observaciones verifican que existe una mayor sensibilidad de la línea celular Hep G2 a la exposición a las NPs de Fe₃O₄ que incrementa con la concentración y el tiempo (p_valor<0.001 Anexos 6-9).

Figura 24

Viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de exposición a NPs de Fe_3O_4



Nota: ns: sin significancia, **: significancia $p_{\text{valor}}=0.0019$, *** significancia $p_{\text{valor}}=0.0002$, **** significancia $p_{\text{valor}}<0.0001$.

Tabla 2

Análisis estadístico entre las líneas celulares Hep G2 e IMR-90

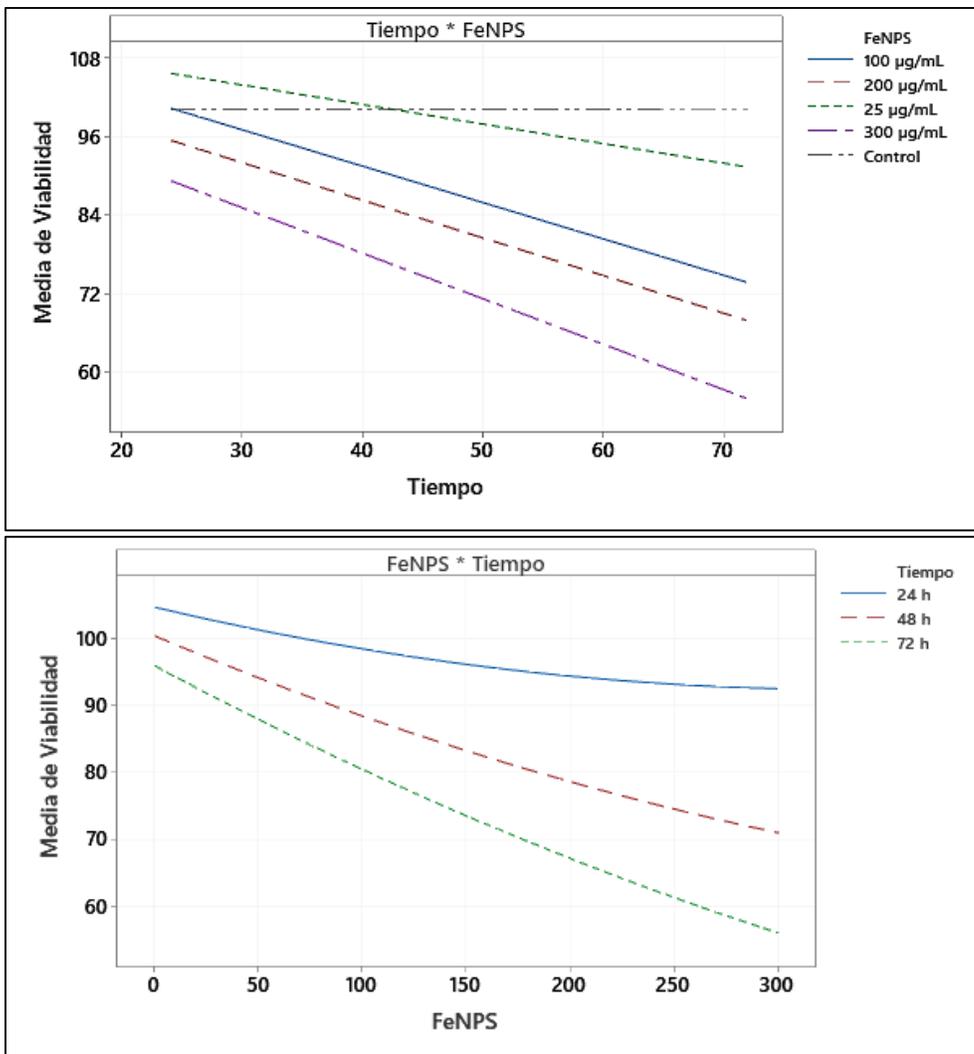
24 horas					
HepG2 - IMR-90	Dif. medias	IC (95%)	Significancia	Resumen	p_valor
Control	0.04386	-6.434 to 6.521	No	ns	>0.9999
25 µg/mL	2.592	-3.886 to 9.069	No	ns	0.8159
100 µg/mL	2.839	-3.638 to 9.317	No	ns	0.7534
200 µg/mL	-2.787	-9.265 to 3.691	No	ns	0.7672
300 µg/mL	-7.792	-14.27 to -1.314	Yes	*	0.0119
48 horas					
HepG2 - IMR-90	Dif. medias	IC (95%)	Significancia	Resumen	p_valor
Control	0.02238	-5.839 to 5.883	No	ns	>0.9999
25 µg/mL	-7.564	-13.42 to -1.703	Yes	**	0.0061
100 µg/mL	-7.463	-13.32 to -1.602	Yes	**	0.007
200 µg/mL	-18.77	-24.63 to -12.91	Yes	***	0.0003
300 µg/mL	-22.5	-28.36 to -16.64	Yes	****	<0.0001
72 horas					
HepG2 - IMR-90	Dif. medias	IC (95%)	Significancia	Resumen	p_valor
Control	0.3378	-5.859 to 6.535	No	ns	>0.9999
25 µg/mL	-8.918	-15.12 to -2.721	Yes	**	0.0019
100 µg/mL	-24.5	-30.70 to -18.30	Yes	***	0.0002
200 µg/mL	-24.55	-30.74 to -18.35	Yes	****	<0.0001
300 µg/mL	-35.43	-41.63 to -29.23	Yes	****	<0.0001

Nota: Se utilizó el estadístico de comparaciones múltiples entre medias Sidak en el software *Infostat*.

Se analizó además el efecto de la concentración y el tiempo de exposición a las NPs en cada línea celular mediante el estadístico ANOVA para datos normalizados (diseño de arreglo factorial 3x5). Se hizo la comparación de medias con el análisis estadístico Tukey (95% de confianza) y un modelado de regresión lineal múltiple con el Software *Minitab19* para las interacciones entre el tiempo y la concentración de NPs (Figura 25 y Figura 26).

Figura 25

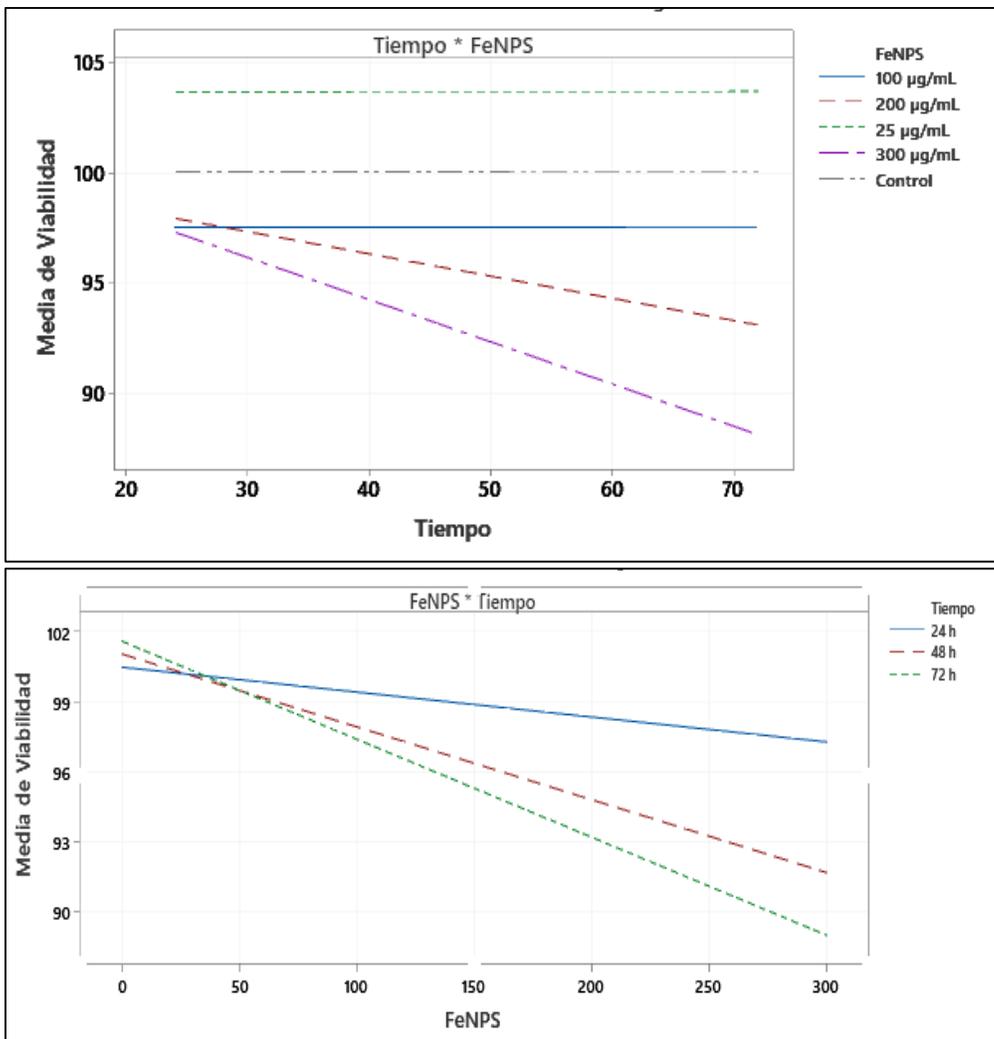
Interacción de la concentración de FeNPs y tiempo de exposición- línea celular Hep G2



Nota: La viabilidad cambia en el tiempo en relación directa con la concentración de FeNPs. En el primer gráfico se observa que la concentración 25ug/mL se diferencia del control a partir de las 48h. En el segundo gráfico se evidencia que existe diferencia en todos los tiempos de exposición.

Figura 26

Interacción de la concentración de FeNPs y tiempo de exposición- línea celular IMR-90



Nota: La viabilidad cambia en el tiempo en relación directa con la concentración de FeNPs a partir de 200 ug/mL a las 48h de exposición a las nanopartículas.

Ensayo de estrés oxidativo

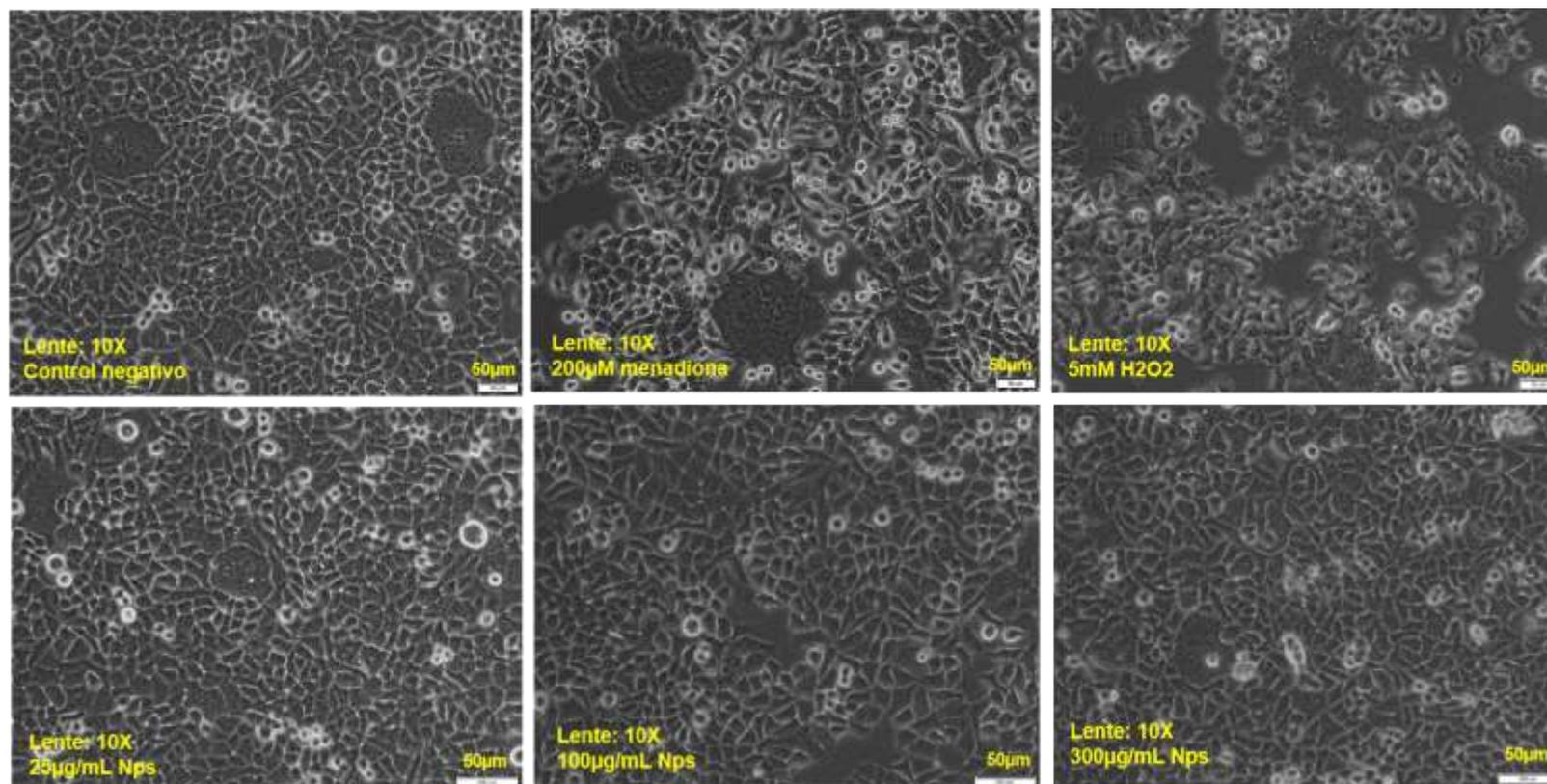
El ensayo de estrés oxidativo para 3 concentraciones de NPs (25, 100 y 300µg/mL) incluyeron controles negativos sin exposición, controles positivos con H₂O₂ (3 y 5mM) y con menadiona (200µM). Las células IMR-90 fueron más sensibles a la acción de los controles positivos en comparación con la línea celular Hep G2. Por el contrario, al comparar con el control (-), los tratamientos con las NPs tuvieron mayor % de células ROS (+) en la línea celular Hep G2 que en la IMR-90 (Tabla 3 y Tabla 4). El aumento de células ROs (+) fue dependiente de la concentración de NPs de Fe₃O₄, y se mantuvo en el tiempo para la línea celular Hep G2.

La división de las poblaciones de células ROS (+) y ROS (-) se realizó en base a los controles, en especial a los controles (+). El literal a, en las figuras 28, 29 y 30 muestran los ensayos de estrés oxidativo en la línea celular Hep G2, donde se puede ver la división de dos poblaciones superpuestas con respecto al índice de tamaño. En los ensayos en las células IMR-90, en cambio se ve una prolongación de la población ROS (-) con respecto al índice de tamaño (Figuras 31, 32 y 33).

A nivel microscópico, en la línea celular Hep G2 se evidenció un cambio claro en la morfología celular tanto en los controles positivos, como en las células expuestas a las NPs. En el control positivo de H₂O₂ se observó un redondeamiento de las células. Mientras que, la forma de las células expuestas a las NPs de Fe₃O₄ se observó parecida a la morfología vista el control (+) de 200µM de menadiona, sobre todo a la mayor concentración (300µg/mL) a las 72 horas (Tabla 3). En la línea celular IMR-90 solo se diferenciaron cambios en los controles positivos (Tabla 4).

Figura 27

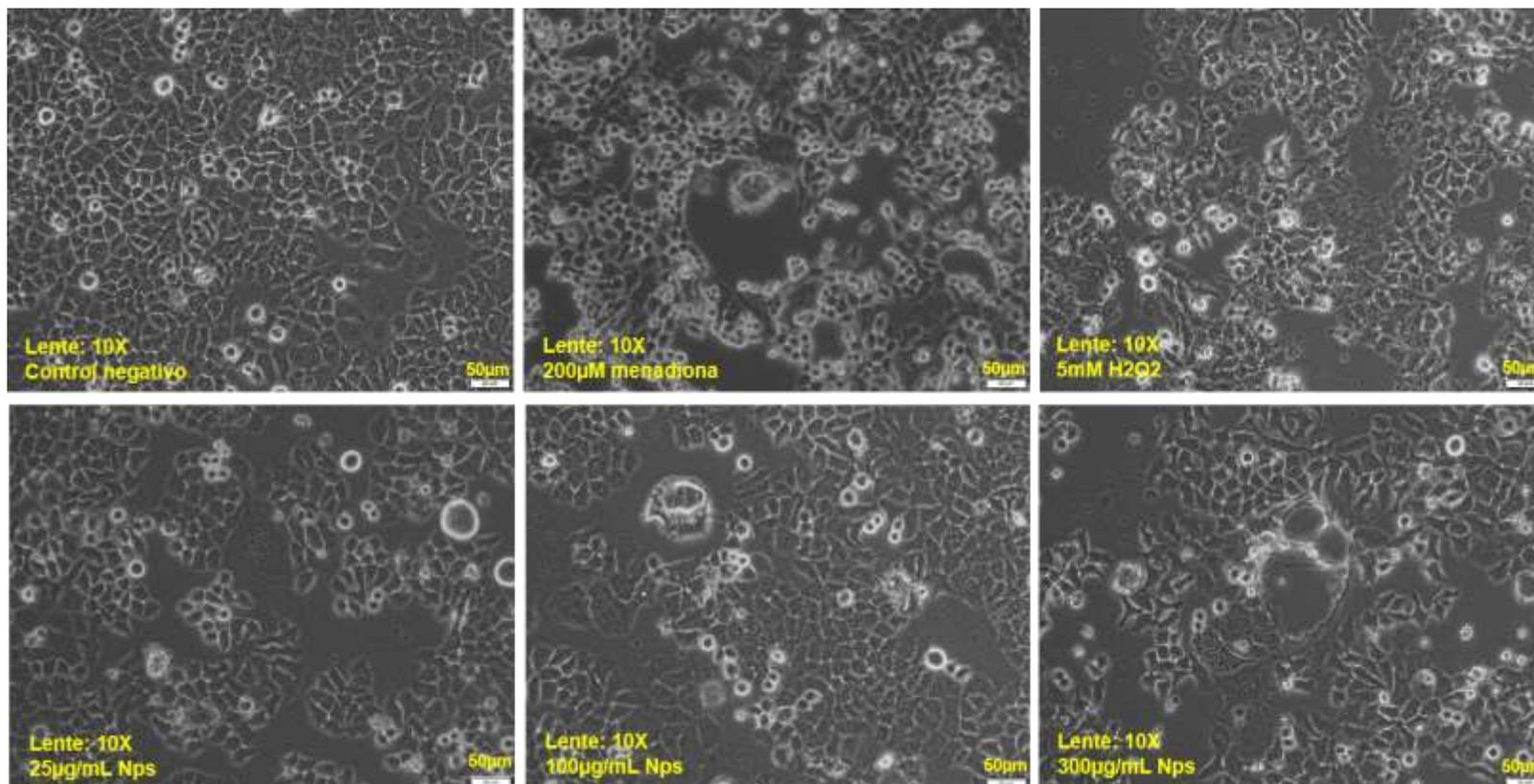
Ensayo de estrés oxidativo a las 24 horas de exposición línea celular Hep G2



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio Olympus IX53. Lente 10X.

Figura 28

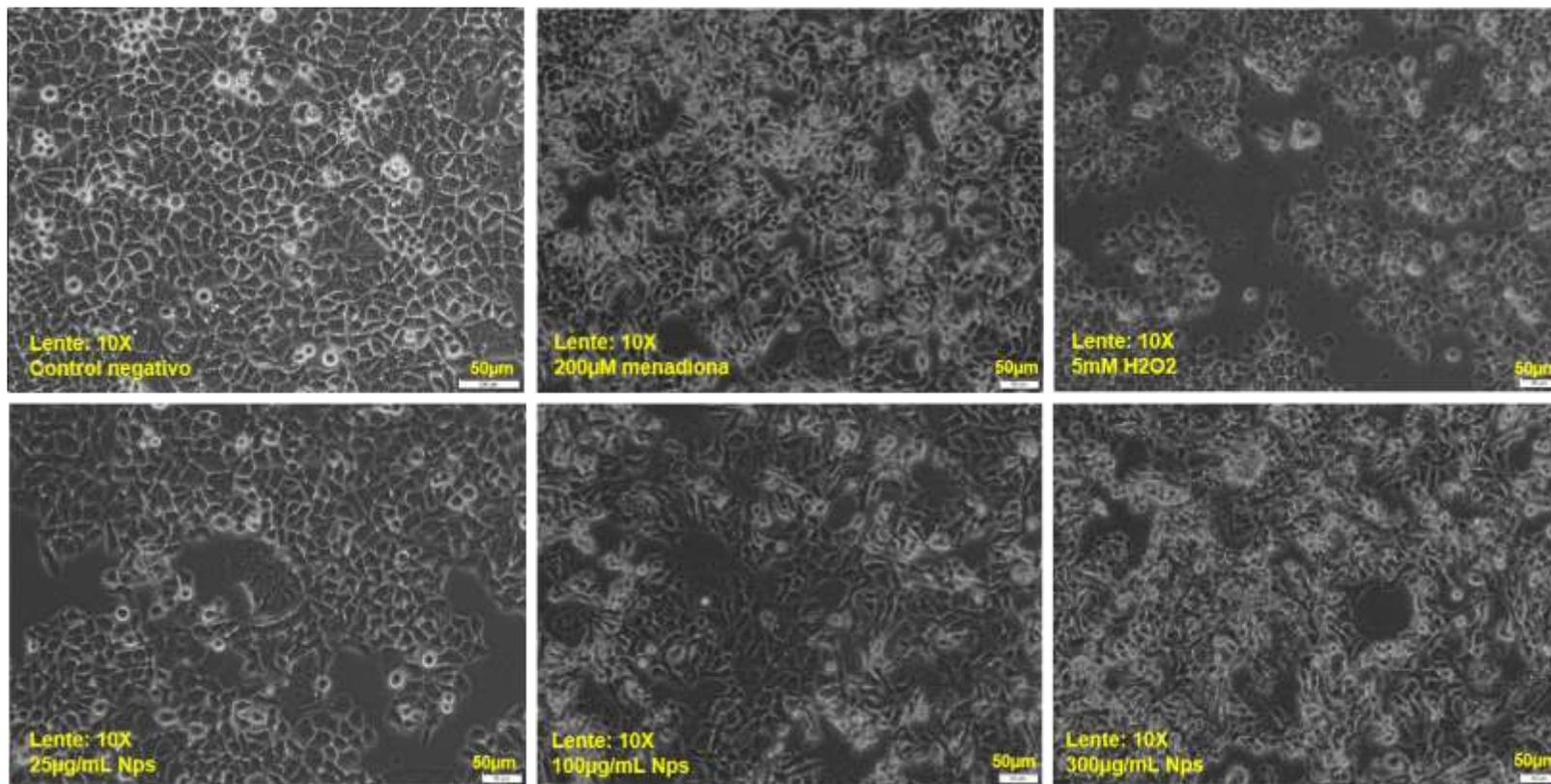
Ensayo de estrés oxidativo a las 48 horas de exposición-línea celular Hep G2



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio *Olympus IX53*. Lente 10X.

Figura 29

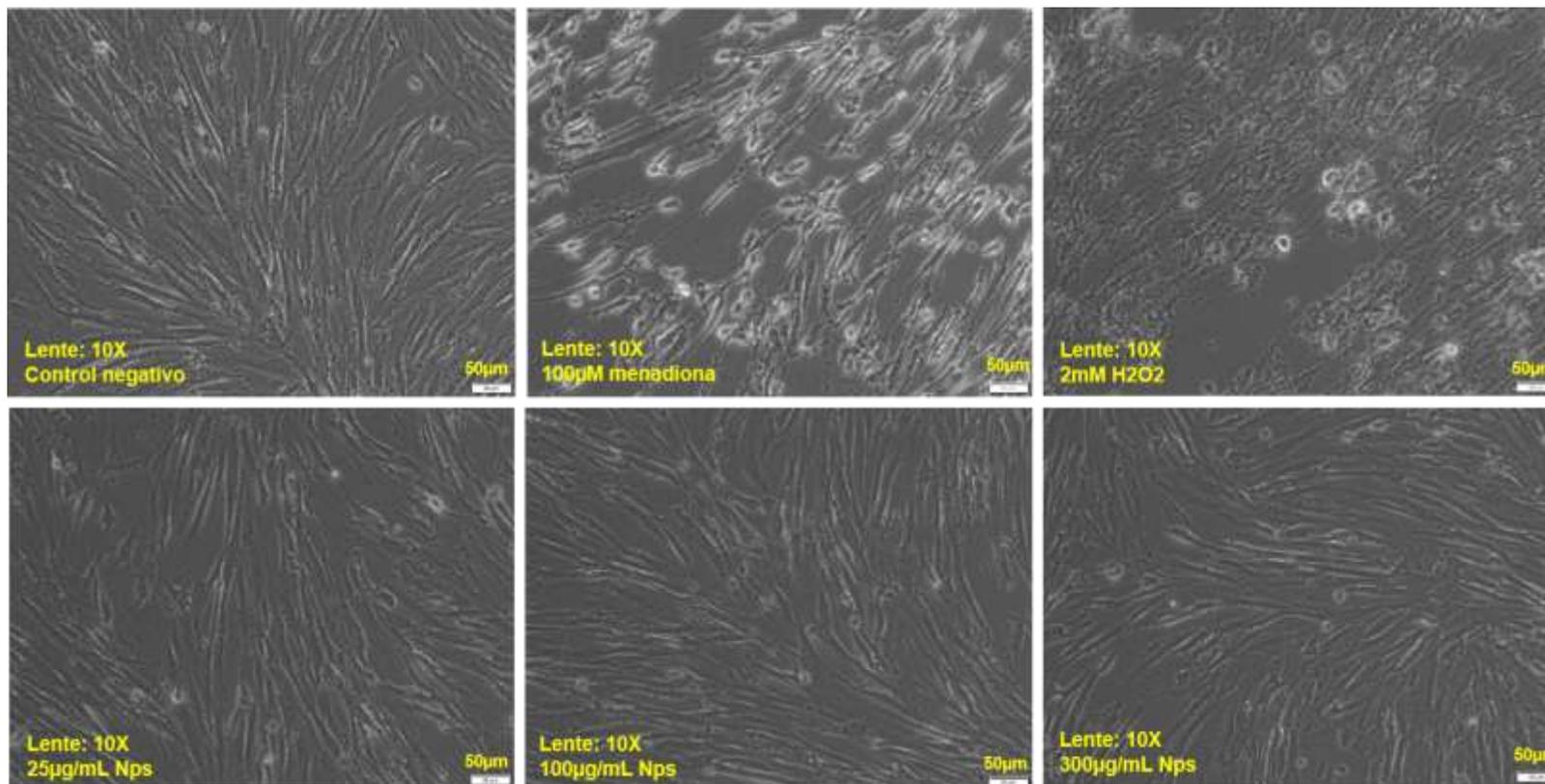
Ensayo de estrés oxidativo a las 72 horas de exposición-línea celular Hep G2



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio *Olympus IX53*. Lente 10X.

Figura 30

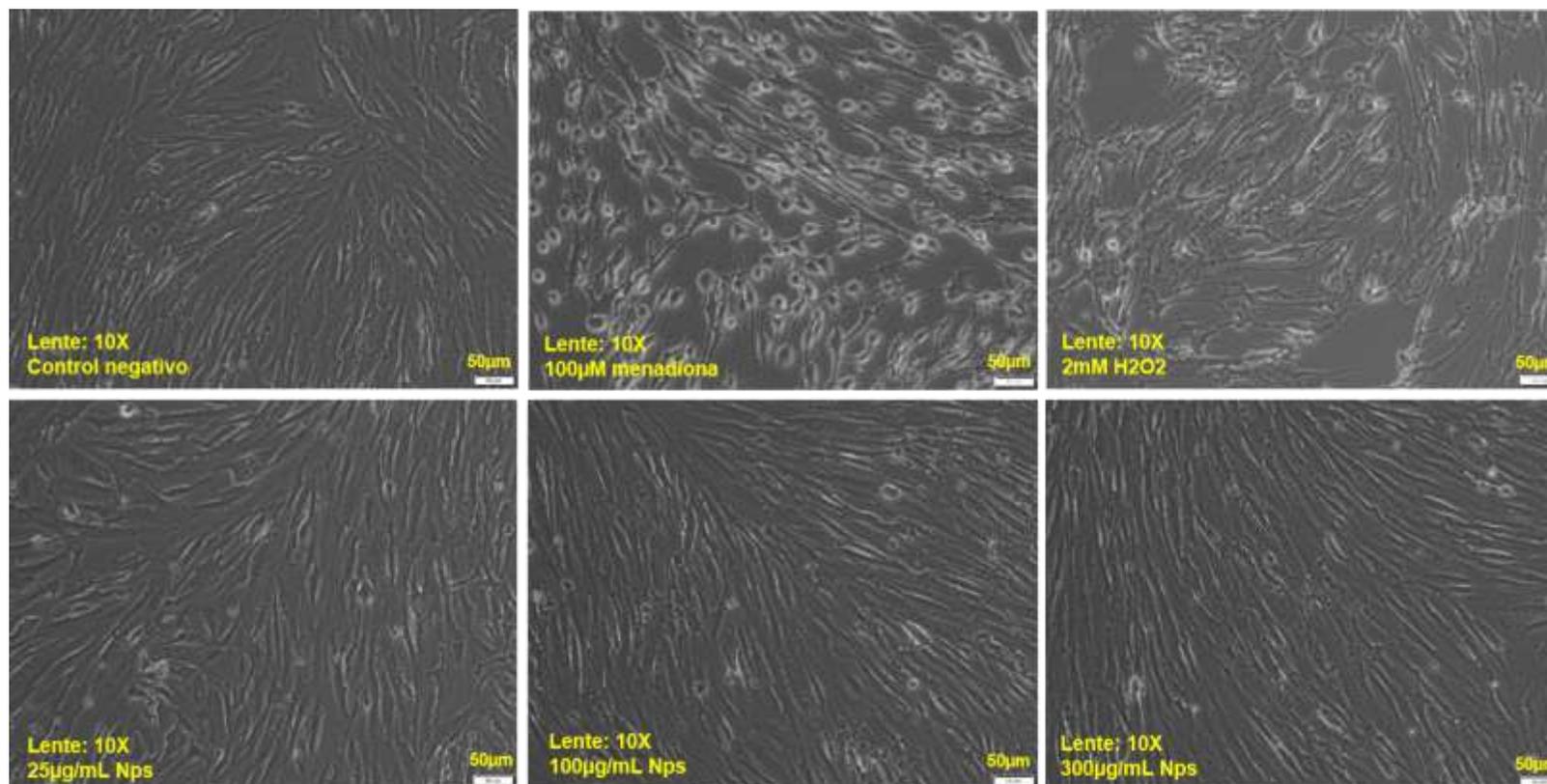
Ensayo de estrés oxidativo a las 24 horas de exposición-línea celular IMR-90



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio *Olympus IX53*. Lente 10X.

Figura 31

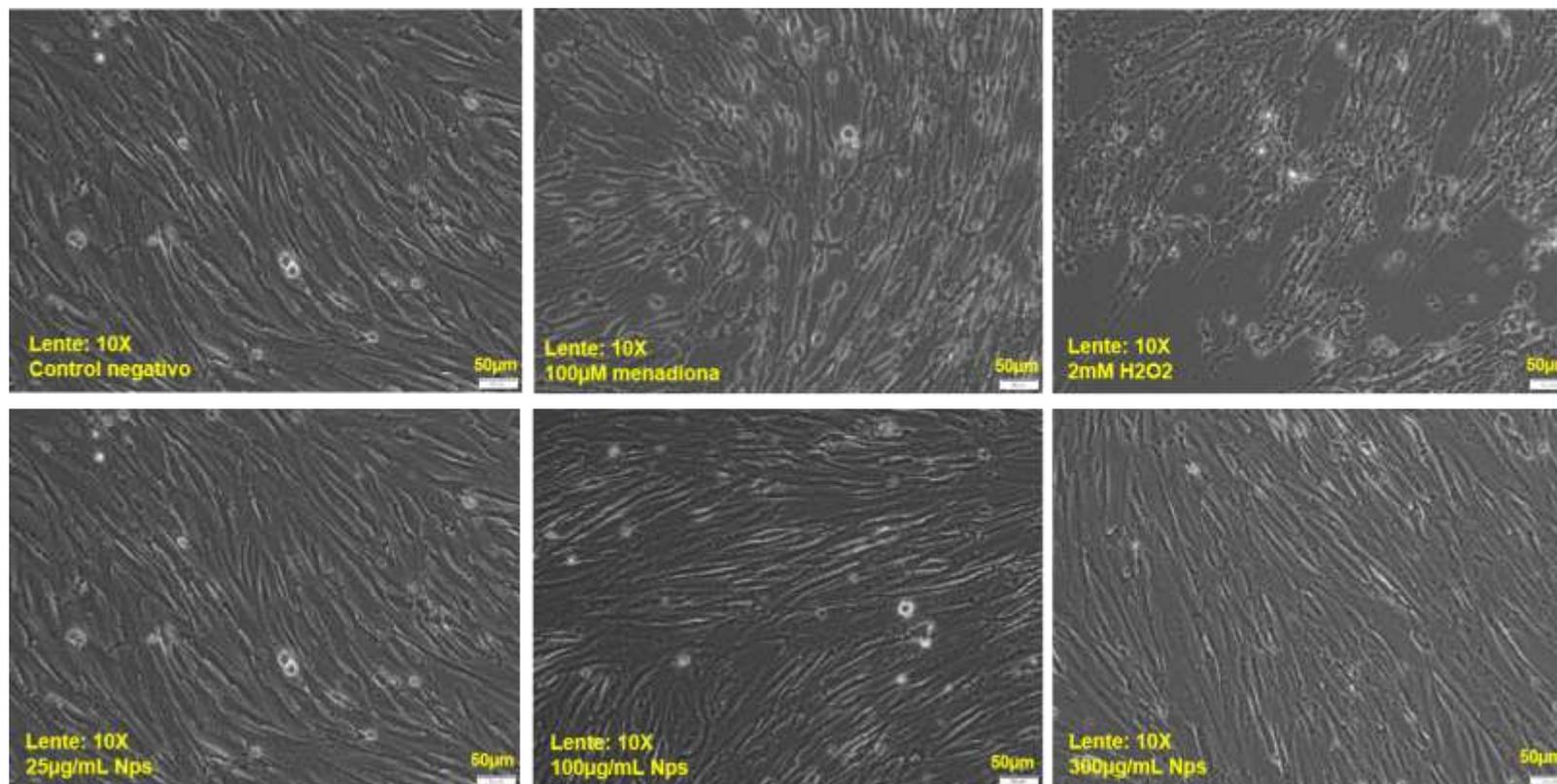
Ensayo de estrés oxidativo a las 48 horas de exposición-línea celular IMR-90



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio *Olympus IX53*. Lente 10X.

Figura 32

Ensayo de estrés oxidativo a las 72 horas de exposición-línea celular IMR-90



Nota: Fotografías tomadas en el microscopio *Olympus IX53*. Lente 10X.

Tabla 3*Datos obtenidos del ensayo de estrés oxidativo en la línea celular Hep G2*

24 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	80.97%	19.03%	-	-
3mM H2O2	60.01%	39.99%	-	-
5mM H2O2	-	-	69.07%	30.93%
Menadiona	52.47%	47.80%	-	-
25 µg/mL	73.43%	26.57%	74.93%	25.07%
100 µg/mL	70.83%	29.17%	67.22%	32.78%
200 µg/mL	57.17%	42.83%	57.17%	42.83%
48 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	78.83%	21.17%	-	-
5mM H2O2	58.50%	40.77%	-	-
3mM H2O2	-	-	66.47%	33.53%
Menadiona	42.74%	56.47%	-	-
25 µg/mL	71.87%	28.13%	70.53%	29.47%
100 µg/mL	70.03%	29.97%	70.63%	29.37%
200 µg/mL	52.30%	47.23%	51.17%	48.40%
72 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	78.83%	21.17%	-	-
5mM H2O2	60.53%	39.47%	-	-
3mM H2O2	-	-	68.31%	31.69%
Menadiona	57.50%	42.50%	-	-
25 µg/mL	75.80%	24.20%	69.97%	30.03%
100 µg/mL	64.20%	35.80%	65.87%	34.13%
200 µg/mL	57.42%	42.58%	57.43%	42.57%

Tabla 4

Datos obtenidos del ensayo de estrés oxidativo en la línea celular IMR-90

24 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	80.97%	19.03%	-	-
1mM H2O2	46.60%	53.40%	-	-
2mM H2O2	-	-	32.97%	67.03%
Menadiona	25.43%	74.57%	-	-
25 µg/mL	78.62%	21.38%	78.87%	21.13%
100 µg/mL	81.40%	18.60%	77.27%	22.73%
200 µg/mL	75.03%	24.97%	77.81%	22.19%
48 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	87.20%	12.80%	-	-
1mM H2O2	44.23%	55.77%	-	-
2mM H2O2	-	-	41.27%	58.73%
Menadiona	35.47%	64.53%	-	-
25 µg/mL	84.50%	15.50%	85.47%	14.63%
100 µg/mL	83.47%	16.53%	84.93%	15.07%
200 µg/mL	79.27%	20.83%	79.57%	20.43%
72 horas				
	Repetición 1		Repetición 2	
Tratamientos	Células ROS (-)	Células ROS (+)	Células ROS (-)	Células ROS (+)
Control negativo	88.80%	11.20%	-	-
1mM H2O2	42.50%	57.50%	-	-
2mM H2O2	-	-	44.47%	55.53%
Menadiona	23.13%	76.87%	-	-
25 µg/mL	79.77%	20.33%	79.60%	20.40%
100 µg/mL	82.47%	17.53%	82.40%	17.60%
200 µg/mL	85.03%	14.97%	83.63%	16.37%

Capítulo V: Discusión

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4)

El primer indicio de la formación de nanopartículas de Fe_3O_4 fue la obtención de una solución homogénea de coloración negra. La primera medición de las NPs se realizó por DLS. El diámetro hidrodinámico obtenido en el DLS muestra diferencia con el tamaño individual de las NPs obtenido en TEM (~ 99 vs 8 nm). El equipo TEM es el equipo más utilizado en la caracterización de las NPs por su alta resolución en la toma de imágenes (Souza et al., 2016). Los tamaños de las nanopartículas individuales en las imágenes del TEM muestra una distribución homogénea, pero se observan agregados. El método de síntesis de co-precipitación es el método más sencillo para la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 y permite obtener altos volúmenes de NPs, pero el control del tamaño y agregación de las NPs puede ser más complicado que en otros protocolos (Heo et al., 2014). En este caso se observan agregados de NPs.

El DLS, en su lugar toma datos relativos del tamaño de las nanopartículas, en función de su movimiento (diámetro hidrodinámico), dando valores de tamaño mayores a las observadas por TEM (Lin et al., 2014). Sin embargo, la monodispersión de la muestra, su facilidad de uso y reproductibilidad, permite usar la técnica de DLS en las mediciones de estabilidad de las NPs en el tiempo (Koo et al., 2019; Lin et al., 2014). Los resultados en DLS sugieren que el PEG al 40% permitió mantener la estabilidad de las NPs de Fe_3O_4 en el tiempo. La solución de PEG así como otros compuestos orgánicos e inorgánicos han sido muy usados para prolongar la estabilidad y dispersión de las NPs. La composición orgánica del PEG además no interfiere con la caracterización de las nanopartículas (Popescu et al. 2020).

Los análisis de XRD demostraron que las nanopartículas sintetizadas corresponden a magnetita (Fe_3O_4). A los 30 días de síntesis las NPs de Fe_3O_4 con cobertura de PEG al 40% permanecieron con la misma composición. Sin embargo, las NPs de Fe_3O_4 que no tuvieron la cubierta de PEG redujeron los picos correspondientes a la magnetita, lo que indica un cambio en la composición. Tal como lo mencionan Thuy, Anh, Tri, Van Hoang, & Nhut (2019) darle una cobertura a las nanopartículas, sea esta orgánica o inorgánica, se les otorga una protección ante la oxidación o cambios que puedan ocurrir por factores ambientales.

Los ensayos de estabilidad en condiciones de cultivo celular arrojaron un incremento en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en la con y sin cubierta PEG ($144.96 \pm 2.03 \text{ nm}$ y $164.24 \pm 5.32 \text{ nm}$, respectivamente). El principal contribuyente a la agregación de las NPs en el medio de cultivo es el suero. Pero el PEG disminuye la interacción de las NPs con las proteínas séricas y plasmáticas, lo que en el organismo mejora el tiempo de vida media en la circulación, evita su rápida eliminación vía opsonización y mejora la especificidad de internalización (Alexis, Pridgen, Molnar, & Farokhzad, 2008).

Para los ensayos de viabilidad celular se eligieron las NPs de Fe_3O_4 con cubierta de PEG, no solo por sus características de estabilidad, tamaño y composición mantenida en el tiempo, sino también porque el PEG hace a las nanopartículas biocompatibles y se ha evidenciado que puede dar lugar al fenómeno de EPR (permeabilidad y retención mejoradas) (S. Li & Huang, 2010).

Curvas de crecimiento para las líneas de celulares Hep G2 e IMR-90

Dentro del tiempo de vida (o esperanza de vida) de una línea celular, las características de crecimiento después de cada subcultivo van a seguir un patrón

constante, llegando a la misma densidad celular que tuvieron antes del subcultivo y dando como resultado un crecimiento cíclico (Freshney, 2006). Las líneas celulares normales, poseen un límite de finito de esperanza de vida, determinado con número veces que se ha duplicado su población (pasaje celular). Este es el caso de la línea celular IMR-90, que posee un tiempo de vida de 50 a 58 duplicaciones de la población antes de la senescencia (ATCC, 1975). Por otro lado, las líneas celulares, como Hep G2, tienen una esperanza de vida no-limitada (Donato, Tolosa, & Gómez-Lechón, 2015).

El ciclo de crecimiento puede ser descrito con la curva de crecimiento celular, que permite ver el comportamiento de la línea celular en el tiempo después del subcultivo, lo que es esencial a la hora de probar efectos sobre la viabilidad celular, respuesta a diferentes compuestos o a cambios en el ambiente celular (Gasque, Al-Ahj, Oliveira, & Magalhães, 2014). En este estudio se utilizó el ensayo MTT para estimar la cinética de las líneas celular Hep G2 e IMR-90. La cinética de cada línea celular se utilizó para elegir los tiempos adecuados de la recolección de datos en el ensayo de viabilidad celular, así como tiempos de espera antes y después de la exposición a las nanopartículas de Fe_3O_4 adecuados para cada línea celular.

Los ensayos de citotoxicidad generalmente se realizan cuando la curva de crecimiento se halla en su fase exponencial o logarítmica, debido a que existe mayor estabilidad y uniformidad en el cultivo. Si se analiza la citotoxicidad en la fase de latencia o en la fase de meseta los datos no serán reproducibles (McGaw, Elgorashi, & Eloff, 2014). El modelado de las curvas de crecimiento celular (absorbancia vs tiempo - Figura 18Figura 22), permitió encontrar el intervalo de tiempo que se encuentra en fase exponencial para cada DS_0 (5000, 7500 y 10000 células/pocillo). En la línea celular HepG2 se obtuvo el mayor intervalo para la DS_0 5000 (24 – 120 h), que para las DS_0

7500 y 1000 (24-96h). Para la línea celular IMR-90 el intervalo de crecimiento exponencial inició las 48 h para las 3 DS_0 . Estos datos concuerdan con el análisis de Freshney (2006), quien describe que la fase de latencia puede durar de 12-48 horas después del subcultivo de células adherentes, debido a que la célula se encuentra en un estado de recuperación del citoesqueleto y la matriz celular, antes de volver al ciclo celular.

En la línea celular Hep G2 la fase de meseta para las DS_0 7500 y 1000 llega a las 72 horas debido a que la saturación del sustrato. A densidades celulares muy altas se empiezan a limitar los nutrientes, lo que lleva a una detención en el ciclo celular en células normales, e inducción a la apoptosis en células transformadas (Witzel, Fritsche, Lehmann, Sieber, & Blüthgen, 2015). En la línea celular IMR-90, pese a que se observó una reducción en la absorbancia a las 168 h, el modelado de las curvas no evidenció un arresto en la proliferación en el período de tiempo analizado. Jin & Zhang (2013) ghallaron que esta línea celular puede llegar a la fase meseta hasta después de 2 semanas de cultivo in vitro.

DS_0 apropiada toma en cuenta la duración de la fase exponencial, la linealidad de la curva en esta zona y los valores de la absorbancia, debido a que los compuestos utilizados pueden inducir citotoxicidad por varios mecanismos, que dependen del tiempo de exposición (Riss & Moravec, 2004). Además, según las recomendaciones de ATCC (2011), el número de células que debe utilizarse con el ensayo MTT para ver cambios en la proliferación celular, debe encontrarse en la porción lineal de la fase exponencial de la curva de crecimiento celular y debe estar entre los valores de 0.75 y 1.25 de la absorbancia medida a los 570nm. Debido a que se requería evaluar el efecto de las NPs de Fe_3O_4 en la viabilidad celular de 24 a 72 horas de exposición, se escogió la DS_0 5000 para la línea Hep G2 y DS_0 10000 para la línea IMR-90. Las DS_0 también

cumplían con la linealidad (Figura 20 y Figura 23) y los valores de absorbancia requeridos por el ensayo.

Viabilidad de líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4)

Las líneas celulares son ampliamente utilizadas como modelos de estudios *in vitro* de múltiples enfermedades, así como del metabolismo de xenobióticos, acción farmacológica de compuestos, etc. (Gomez, Donato, Lahoz, & Castell, 2008). El cultivo de líneas celulares provee de materia prima para estudios biológicos, donde se tienen ventajas de crecimiento relativamente rápido, poblaciones homogéneas, clonalidad y demás (Li, 2011). Existen varias pruebas que permiten hacer un screening inicial de la respuesta ante posibles agentes dañinos en cultivo celular. En este estudio se llevó a cabo el ensayo de tetrazolio (MTT) para observar cambios en la viabilidad de las líneas celulares Hep G2 e IMR-90 expuestas a NPs de Fe_3O_4 . La prueba de MTT es muy concurrenida en células adherentes por su facilidad de uso, capacidad de ensayos múltiples costo-efectivos, bajo ruido de fondo (Tolosa, Donato, & Gómez, 2015).

El ensayo de viabilidad celular MTT, demostró que línea celular Hep G2 se ve más afectada que la de la línea celular IMR-90. Esto puede deberse al diferente procesamiento de las NPs de Fe_3O_4 entre las dos líneas celulares. Por un lado, las nanopartículas de magnetita se han descrito como seguras y biológicamente compatibles en algunos modelos *in vitro* e *in vivo* (Valdiglesias et al., 2016). Han sido utilizadas para diagnóstico de imagen como resonancia magnética y tomografía, e incluso fueron aprobadas por la FDA para el tratamiento de deficiencia de hierro en la leucemia mieloide en la presentación de ferumoxytol (Kowalczyk, Banach, & Rysz, 2011). Pero, por otro lado, existe evidencia de que la acumulación de las NPs de óxido

de hierro en otros modelos celulares, puede promover la producción de ROS, causar daño y muerte celular (Naqvi et al., 2010). El metabolismo del hierro juega un papel importante para mantener la homeostasis en células normales, pero en células cancerígenas no existe este balance. De hecho, las células de cáncer se sirven de la desregulación del exportador de hierro celular “ferroportin” y la sobreexpresión del importador de hierro “transferrin” para aumentar su tasa de proliferación y permitir la rápida progresión del tumor (Bogdan et al., 2016). Este podría ser el factor clave que diferencie la respuesta entre las líneas celulares Hep G2 (carcinoma hepático) e IMR-90 (fibroblasto normal de pulmón). Lo que cuerda con otro reporte de citotoxicidad dependiente del tipo de célula en las líneas HeLa (cáncer cervical) y RPE (normal de pigmento retinal) (L. Li et al., 2012).

Otros factores también pueden influir sobre efecto de las NPs de Fe_3O_4 como la concentración, tiempo de exposición y las características de las NPs. De ellos, parece ser que la concentración es el factor que tienen mayor peso a la hora de generar actividad tóxica o no tóxica. Por ejemplo, los estudios de Naqvi et al. (2010) probaron que, las concentraciones de 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pueden inducir estrés oxidativo y reducir la viabilidad celular a 65 y 55%, en cambio las concentraciones de 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no causaron una disminución significativa en el % de viabilidad. Por otro lado, Hanot, Choi, Anani, Soundarrajan, & David (2015) notaron que la cobertura de las nanopartículas es también un importante mediador de la citotoxicidad, debido a la captura celular. Y más aún, el estudio *in vitro* de Mojica et al. (2014) concluyó que el PEG mejoró la internalización celular de las NPs de Fe_3O_4 con respecto a otras coberturas en células Vero.

Ensayo de estrés oxidativo

El estudio continuó con el análisis de los niveles de ROS intracelular, que permiten conocer el estado oxidativo en la célula. La pérdida del balance redox celular desencadena un estado de estrés oxidativo (EO) y si la célula no es capaz reponer la homeostasis puede generarse un daño inminente (muerte celular regulada) (Yokoyama et al., 2017). La presencia de ROS se midió con la técnica miniaturizada de medición de fluorescencia por citometría en el equipo Muse Cell Analyzer de Luminex.

En el modelo celular Hep G2 se evidenció un gran aumento en el porcentaje de células ROS (+) en los tratamientos con NPs de Fe_3O_4 , que pudo deberse a la acumulación de las nanopartículas, lo que no ocurrió en las células IMR-90. La acumulación celular de NPs de Fe_3O_4 puede desplegar una cadena de ROS. En el interior de la célula, la cubierta de las nanopartículas es degradada y las nanopartículas de óxido de hierro quedan descubiertas, en este punto los iones Fe^{3+} y/o Fe^{2+} en su superficie pueden entrar en contacto con el H_2O_2 celular y generar varias ROS (OH^- , $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$), por la reacción Fenton (Ramírez, 2015).

En el estudio de los niveles de ROS se utilizó el dihidroetidio que mide específicamente la cantidad de anión superóxido intracelular. Pese a que el anión superóxido suele ser una de las ROS más abundante en el estado de estrés oxidativo, este anión puede pasar a formar otras ROS, especialmente OH^- y $\cdot\text{OH}$ al seguir reaccionando. Sería conveniente medir los niveles totales de ROS generadas (Yazdani, 2015).

Las poblaciones celulares fueron separadas principalmente con respecto a los controles (+). La línea celular IMR-90 muestra un desplazamiento de las células ROS (-) con respecto al índice de tamaño celular. Este puede ser un problema debido a

agregados celulares. Las células adherentes necesitan un tratamiento previo que las desprenda de la superficie de adherencia, en este caso se utilizó la tripsina-EDTA (0.25%). El proceso de tripsinización puede generar cúmulos celulares. Los agregados de células, en lugar de las células individuales, pueden modificar la distribución de las poblaciones. Incluso una dupleta de células que pase por el rayo incidente, puede cambiar el ángulo de dispersión frontal en la medición y detectar diferentes índices de tamaño para un mismo tipo celular. En estos casos es necesario el uso de disgregantes antes del ensayo (Givan, 2011; Houtz, Trotter, & Sasaki, 2004).

El efecto del tiempo de exposición en la viabilidad puede vincularse con el EO y un subsecuente mecanismo de muerte celular regulada (RCD) (Tang et al., 2019). Se conoce que el H₂O₂ en concentraciones de 3 y 5 mM puede provocar RCD vía apoptosis por el estímulo del EO (Troyano et al., 2003). De otra forma, se ha registrado que la menadiona induce RCD por la vía ferroptótica (Lakhter et al., 2014). La morfología de las células Hep G2 (Figura 29) muestra un daño parecido al causado por la menadiona (200µM). La ferroptosis es una de las posibles ruta de muerte de las células Hep G2 tratadas, pues guarda una estrechamente relación con el metabolismo del hierro en las células, dónde la presencia de Fe²⁺ o Fe³⁺ puede generar estrés oxidativo, peroxidación lipídica y muerte celular (Xie et al., 2016). No obstante es importante definir la ruta de muerte celular con una caracterización más exhaustiva.

Capítulo VI: Conclusiones

El método de co-precipitación de las sales Fe^{2+} y Fe^{3+} en hidróxido de sodio (NaOH) y sulfito de sodio (Na_2SO_3), permitió sintetizar las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) en una solución homogénea de color negro. Los análisis DLS, TEM y XRD permitieron conocer el diámetro hidrodinámico, la forma, el tamaño y verificar la composición de las de óxido de hierro (Fe_3O_4) con y sin cobertura de PEG.

El tamaño y la composición de las NPs sin cobertura PEG 40% presenta variación a los 30 días de síntesis. Por lo tanto, el PEG le dio mayor estabilidad en el tiempo y en condiciones de cultivo celular a las nanopartículas óxido de hierro (Fe_3O_4) sintetizadas por co-precipitación en este trabajo.

Las curvas de crecimiento de la línea celular tumoral de hígado HepG2 y la línea celular normal de pulmón IMR-90 permitieron ver el comportamiento de la línea celular en el tiempo y hallar las densidades de siembra apropiados para los ensayos de viabilidad celular (5 000 y 10 000 células/pocillo, respectivamente) y estrés oxidativo (150 000 y 180 000 células/pocillo, respectivamente).

Las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) tienen un efecto citotóxico mayor en células de carcinoma hepático Hep G2 que en células normales de pulmón IMR-90. Esto se verificó mediante los ensayos de viabilidad celular y la cuantificación de especies reactivas de oxígeno, donde se identificó que el resultado fue dependiente de la línea celular, la concentración de nanopartículas y el tiempo de exposición para ambos casos.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda:

- Verificar la estabilidad de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) en condiciones de cultivo celular por el método TEM.
- Verificar la internalización de las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) e identificar la localización a nivel celular.
- Hacer pruebas de disgregación celular previo a la cuantificación de células ROS (+) y ROS (-), para definir mejor las poblaciones celulares.
- Realizar otros ensayos que evidencien el estrés oxidativo: comprobación de ROS por otros métodos como el DCFA, marcaje de daño a biomoléculas (ácidos nucleicos, peroxidación lipídica, etc.) y medición de enzimas antioxidantes.
- Identificar la ruta de muerte de las líneas celulares frente a la exposición a las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4).

Bibliografía

- Acuña, R., Sengul, H., Steehouwer, M., van de Vorst, M., Vermeulen, S., Kiemeneij, L., ... Hoischen, A. (2017). Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *American Journal of Human Genetics*, 101(1), 50–64.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.05.013>
- Aggarwal, V., Tuli, H., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M., Sak, M., ... Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110735>
- Aguilar, D. (2014). *Construcción de un modelo de supervivencia celular basado en el efecto de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en el conteo celular de leucocitos periféricos humanos y HepG2*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L., & Farokhzad, O. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 5, pp. 505–515). American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- American Cancer Society. (2019, April 1). Tasas de supervivencia del cáncer de hígado. Retrieved May 4, 2020, from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/tasas-de-supervivencia.html>
- ATCC. (1975). *IMR-90(ATCC CCL-186) Product Sheet*.
- ATCC. (2006). Hep G2 [HEPG2] (ATCC ® HB- 8065™).
- BD Biosciences. (2002). *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*.
- Blackadar, C. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>
- Bogdan, A., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Regulators of Iron

- Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.012>
- Botelho, M., & Richter, J. (2019). Editorial: Parasites and Cancer. *Frontiers in Medicine*, 6, 55. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00055>
- Clavel, J. (2007). Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *Comptes Rendus - Biologies*, 330(4), 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.02.012>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Deferme, L., Briedé, J., Claessen, S., Cavill, R., & Kleinjans, J. (2015). Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: A toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 845–855. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.007>
- Dev, S., & Babitt, J. (2017, July 1). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>
- Donato, M., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (Vol. 1250, pp. 77–93). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Freshney, R. (2006). Basic Principles of Cell Culture. In *Culture of Cells for Tissue*

Engineering (pp. 3–22). Hoboken, NJ, USA: Wiley Blackwell.

<https://doi.org/10.1002/0471741817.ch1>

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ...

Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death:

Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58–73.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G.

(2018, March 1). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the

Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*.

Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Gardener, M. (1994). The Virus Cancer Program of the 1970s: A Personal and

Retrospective View - PubMed. *Laboratory Animal Science*, 44(2), 101–113.

Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8028270/>

Gasque, K., Al-Ahij, L., Oliveira, R., & Magalhães, A. (2014). Cell density and solvent are

critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. *Brazilian Archives*

of Biology and Technology, 57(3), 381–385. <https://doi.org/10.1590/S1516->

[89132014005000007](https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000007)

Ghazanfari, M. R., Kashefi, M., Shams, S. F., & Jaafari, M. R. (2016). Perspective of

Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochemistry Research*

International, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7840161>

Givan, A. L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods in Molecular Biology*

(Clifton, N.J.). https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1

Global Burden of Disease Cancer. (2017). Global, regional, and national cancer

incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-

adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for

the Global Burden of Disease Study Global Burden of Disease Cancer

- Collaboration. *JAMA Oncology*, 3(4), 524–548.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>
- Gomez, M., Donato, M., Lahoz, A., & Castell, J. (2008). Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. *Current Drug Metabolism*, 9(1), 1–11.
<https://doi.org/10.2174/138920008783331086>
- Gorrini, C., Harris, I., & Mak, T. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 931–947.
<https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Hamid, A., Tesfamariam, S., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2013). Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). *Oncology Letters*, 5(4), 1087–1092.
<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanot, C. C., Choi, Y. S., Anani, T. B., Soundarrajan, D., & David, A. E. (2015). Effects of iron-oxide nanoparticle surface chemistry on uptake kinetics and cytotoxicity in CHO-K1 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms17010054>
- Harris, I., Treloar, A., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K., ... Mak, T. (2015). Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. *Cancer Cell*, 27(2), 211–222.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019>
- Heo, D. N., Min, K. H., Choi, G. H., Kwon, I. K., Park, K., & Lee, S. C. (2014). Scale-Up Production of Theranostic Nanoparticles. In *Cancer Theranostics* (pp. 457–470). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407722-5.00024-4>
- Houtz, B., Trotter, J., & Sasaki, D. (2004). *Tips on Cell Preparation for Flow Cytometric*

Analysis and Sorting Sample Identification and Resolution Protein Concentration and Refractive Index. Retrieved from www.bdbiosciences.com

Huang, J., Sridhar, S., Chen, Y., & Hunt, R. (1998). Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*, 114(6), 1169–1179. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70422-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70422-6)

Huang, X., Dai, J., Fournier, J., Ali, A., Zhang, Q., & Frenkel, K. (2002). Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(1), 84–92. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00770-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00770-5)

Instituto Nacional del Cáncer. (2015, February 9). ¿Qué es el cáncer? Retrieved May 25, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

International Agency for Research on Cancer. (2020, June). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–127 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Retrieved June 27, 2020, from <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jin, J., & Zhang, T. (2013). Effects of Glucose Restriction on Replicative Senescence of Human Diploid Fibroblasts IMR-90. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(4–5), 718–727. <https://doi.org/10.1159/000350090>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Kim-Campbell, N., Gomez, H., & Bayir, H. (2019). Cell Death Pathways: Apoptosis and

- Regulated Necrosis. In C. Ronco, R. Bellomo, J. Kellum, & Z. Ricci (Eds.), *Critical Care Nephrology* (3rd ed., pp. 113-121.e2). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00020-0>
- Koo, K. N., Ismail, A. F., Othman, M. H. D., Bidin, N., & A Rahman, M. (2019). Preparation and characterization of superparamagnetic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles: A short review. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(1), 23–31. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n2019.1224>
- Kowalczyk, M., Banach, M., & Rysz, J. (2011). Ferumoxytol: A new era of iron deficiency anemia treatment for patients with chronic kidney disease. *Journal of Nephrology*, 24(6), 717–722. <https://doi.org/10.5301/jn.5000025>
- Lakhter, A. J., Hamilton, J., Dagher, P. C., Mukkamala, S., Hato, T., Dong, X. C., ... Naidu, S. R. (2014). Ferroxitosis: A cell death from modulation of oxidative phosphorylation and PKM2-dependent glycolysis in melanoma. *Oncotarget*, 5(24), 12694–12703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3031>
- Li, L., Mak, K., Shi, J., Koon, H., Leung, C., Wong, C., ... Pong, P. (2012). Comparative in vitro cytotoxicity study on uncoated magnetic nanoparticles: Effects on cell viability, cell morphology, and cellular uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(12), 9010–9017. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6755>
- Li, S., & Huang, L. (2010, August). Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *Journal of Controlled Release*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.016>
- Li, Z. (2011). In Vitro Micro-Tissue and Organ Models for Toxicity Testing. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 5, pp. 551–563). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00503-1>
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>

Liu, J., & Wang, Z. (2015). Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2–4.

<https://doi.org/10.1155/2015>

Luo, Z., Zhao, Q., Liu, J., Xi, Y., Peng, R., Liao, J., & Diwu, J. (2016). Flow Cytometric Analysis of Intracellular ROS and RNS Production and Curcumin Inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, S103–S104.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.263>

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release*, 65(1–2), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5)

Mahmoud, Z., & Mohammad, A. (2019). Cancer Nanomedicine: A New Era of Successful Targeted Therapy. *Hindawi Journal of Nanomaterial*, 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/4927312>

McCarthy, S., Davies, G., & Gun'ko, Y. (2012). Preparation of multifunctional nanoparticles and their assemblies. *Nature Protocols*, 7(9), 1677–1693.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.082>

McGaw, L., Elgorashi, E., & Eloff, J. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (pp. 181–233). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>

McIlwain, D., Berger, T., & Mak, T. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>

Mirabelli, P., Coppola, L., & Salvatore, M. (2019). Cancer cell lines are useful model

systems for medical research. *Cancers*, 11(8).

<https://doi.org/10.3390/cancers11081098>

Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D., & Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30(July 2018), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>

Mojica, M., Lima, E., Vasquez, M., Tognoli, V., Troiani, H., Pasa, A., ... Zysler, R. (2014). In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. *Journal of Biomedical Materials Research - Applied Biomaterials*, 102(4), 860–868. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33068>

Naqvi, S., Samim, M., Abdin M., Ahmad F., Prashant C., & Dinda, A. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 983. <https://doi.org/10.2147/IJN.S13244>

Navarro, M., & Salvesen, G. (2016). Cell division/death: Apoptosis. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 3, pp. 327–334). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30044-X>

Noda, N., & Wakasugi, H. (2001). Cancer and Oxidative Stress. *Journal of the Japan Medical Association*, 44(12), 1571–1574.

Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012, March). Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

Popescu, R. C., Savu, D., Dorobantu, I., Vasile, B. S., Hosser, H., Boldeiu, A., ...

- Veldwijk, M. R. (2020). Efficient uptake and retention of iron oxide-based nanoparticles in HeLa cells leads to an effective intracellular delivery of doxorubicin. *Scientific Reports*, 10(1), 10530. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67207-y>
- Ramírez, L. (2015). Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles: Are they really safe? *La Granja*, 21(1), 77–83. <https://doi.org/10.17163/lgr.n21.2015.07>
- Reed, W., Cakroll, J., Agramonte, A., & Lazear, J. (1901). The Etiology of Yellow Fever—A Preliminary Note. *The American Journal of the Medical Sciences*, 121(2), 222–223. <https://doi.org/10.1097/00000441-190102000-00019>
- Riss, T., & Moravec, R. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62. <https://doi.org/10.1089/154065804322966315>
- Rivella, S., & Crielard, B. (2014). Disorders of Iron Metabolism: Iron Deficiency and Iron Overload and Anemia of Chronic Diseases. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (pp. 1471–1487). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07903-X>
- Savitha, G., Vishnupriya, V., & Krishnamohan, S. (2017, August 1). Hepatocellular carcinoma- A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Pharmainfo Publications. <https://doi.org/10.2147/jhc.s61146>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., ... Sharifi-Rad, J. (2020, July 2). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2011). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(1), 98–99. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1220>

- Souza, T. G. F., Ciminelli, V. S. T., & Mohallem, N. D. S. (2016). A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 733(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019, May 1). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Thuy, N. T. T., Anh, L. D., Tri, N. H., Van Hoang, C., & Nhut, N. A. (2019). Preparation and characterization of polyethylene glycol coating iron oxide nanoparticles for curcumin delivery. *Asian Journal of Chemistry*, 31(8), 1719–1723. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21941>
- Tolosa, L., Donato, M., & Gómez, M. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1250, pp. 333–348). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26
- Troyano, A., Sancho, P., Fernández, C., de Blas, E., Bernardi, P., & Aller, P. (2003). The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death and Differentiation*, 10(8), 889–898. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401249>
- Valdiglesias, V., Fernández, N., Kiliç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S., ... Laffon, B. (2016, December 1). Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>
- Wang, J., & Qiu, J. (2016). A review of organic nanomaterials in photothermal cancer therapy. *Cancer Research Frontiers*, 2(1), 67–84. <https://doi.org/10.17980/2016.67>
- Witzel, F., Fritsche, R., Lehmann, N., Sieber, A., & Blüthgen, N. (2015). Analysis of impedance-based cellular growth assays. *Bioinformatics*, 31(16), 2705–2712.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv216>

Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., ... Tang, D. (2016). Ferroptosis: Process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 369–379.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>

Yallapu, M. M., Foy, S. P., Jain, T. K., & Labhasetwar, V. (2010). PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications. *Pharmaceutical Research*, 27(11), 2283–2295.

<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0260-1>

Yang, J., Hainaut, P., Gores, G., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 589–604.

<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>

Yazdani, M. (2015). Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. *Toxicology in Vitro*, 30(1), 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.010>

Yew, Y. P., Shameli, K., Miyake, M., Ahmad Khairudin, N. B. B., Mohamad, S. E. B., Naiki, T., & Lee, K. X. (2020). Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 2287–2308.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.04.013>

Yokoyama, C., Sueyoshi, Y., Ema, M., Mori, Y., Takaishi, K., & Hisatomi, H. (2017). Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncology Letters*, 14(5), 6066–6070. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6931>

Anexos