

Evaluación de la citotoxicidad de nanogeles de polivinilpirrolidona (PVP) en fibroblastos murinos

Laura M. García-Rodríguez¹, Daniela Díaz-Jiménez², Olga L. Perez-Guevara¹, Adrián Ges-Naranjo³, Manuel Rapado-Paneque⁴, Ariana Ojalvo-García⁵, Mariolys Verhe-Tamayo⁴, Yenisey Martínez-Plous⁶, Liudy García-Hernández^{4*}, José Antonio Rivera-Tapia^{7*}.

¹Centro para el Control Estatal de Medicamentos y Equipos Médicos, La Habana, Cuba; ²Facultad de Biología, UH, La Habana, Cuba; ³Instituto Superior de Tecnología y Ciencias Aplicadas, La Habana, Cuba; ⁴Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, La Habana, Cuba; ⁵Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba; ⁶Centro de Estudios Avanzados de Cuba; ⁷Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

ABSTRACT

Introduction. Nanogels are extensively studied for diverse biomedical applications. One of the relevant is the use as drugs nano-carriers for therapeutic purposes increasing the bioactivity and transport of active components to specific sites or cells.

Objective. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of 30 nm and 90 nm PVP nanogels in murine fibroblast cells.

Methods. Cytotoxicity was evaluated through lysosomal integrity by neutral red uptake assay in murine fibroblast cell line L-929.

Results. Cytotoxicity results by neutral red uptake assay showed that there are no cytotoxic effects in cells treated with the 30 nm nanogels, at the concentrations of 50, 100, 200 and 300 µg / mL for 24 h and 48 h. However, 90 nm nanogels at 48 h presented certain cytotoxicity when the percent survival was less than 70; this effect was not observed at 24 h.

Conclusion. PVP nanogels were obtained by gamma radiation with an average size of 30 nm and 90 nm approximately. The absence of cytotoxicity of 30 nm PVP nanogels on the L-929 cell line makes them potential candidates for biomedical applications.

RESUMEN

Introducción. Los nanogeles están siendo estudiados para diversas aplicaciones biomédicas. Una de las más relevantes es como portadores de fármacos con propósitos terapéuticos, incrementando la bioactividad y el transporte de componentes activos a sitios o células específicas.

Historial del artículo

Recibido: 22 mar 2019

Aceptado: 11 jul 2019

Disponible online: 1 sep 2019

Palabras clave

citotoxicidad, nanogeles, rojo neutro, fibroblastos.

Keywords

cytotoxicity, nanogels, neutral red, fibroblasts.

Copyright © 2019 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Liudy García-Hernández, Investigadora del Departamento de Física. Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) Dirección: Calle 30 No. 502 esquina 5ta Av., C.P. 10600, Playa La Habana, Cuba. Teléfono: (537)72021518, Fax: (537)72021518.

José Antonio Rivera-Tapia, Investigador del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. correo electrónico: liudy@ceaden.edu.cu, jart70@yahoo.com <http://revistabiomedica.mx>.

Objetivo. Evaluar la citotoxicidad de nanogeles de polivinilpirrolidona (PVP) de 30 y 90 nm en fibroblastos murinos.

Materiales y métodos. Se evaluó la citotoxicidad de nanogeles de PVP a través de integridad lisosomal mediante el ensayo de captación del rojo neutro en fibroblastos murinos L-929.

Resultados. Los resultados de citotoxicidad mostraron que no existen efectos citotóxicos en células tratadas con los nanogeles de 30 nm a las concentraciones de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 y 48 h. Sin embargo, los nanogeles de 90 nm a las 48 h presentaron cierta citotoxicidad al disminuir la sobrevivencia a menos de 70% de células vivas, sin embargo, a las 24 h no se observó este efecto.

Conclusión. Se obtuvieron nanogeles de PVP por radiación gamma con un tamaño promedio de 30 nm y 90 nm. La ausencia de citotoxicidad de los nanogeles sobre la línea celular L-929 los convierte en candidatos potenciales para aplicaciones biomédicas.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología repercute considerablemente en los avances experimentales de diversas áreas científicas, de especial relevancia en las ciencias médicas. Así, su aplicación en biomedicina ha dado lugar a la nanomedicina, una rama que actualmente se encuentra en pleno desarrollo (1). En esta disciplina, bajo el contexto de la búsqueda continua por la eficiencia y compatibilidad entre la nanotecnología y el organismo humano, han surgido nuevas formulaciones basadas en el uso de nanogeles preparados con materiales más efectivos y biocompatibles. Éstos tienen numerosas ventajas con respecto a los sistemas convencionales, debido a que mejoran la liberación y prolongan el tiempo de vida media de fármacos protegiéndolos de los efectos ambientales, muestran efectos secundarios mínimos, así como mejores características de acción y son sistemas más económicos ya que se emplea una menor cantidad de fármacos (2).

Como se ha mencionado, algunos de los sistemas de liberación de fármacos más estudiados involucran la encapsulación o atrapamiento en dispositivos

poliméricos biocompatibles, tales como los micro o nanogeles poliméricos (3,4). Estos nanogeles también son muy prometedores en las aplicaciones de liberación de pequeños agentes biológicamente activos y biomoléculas para lo cual, tienen como ventaja su alta capacidad de carga, estabilidad y la simplicidad de formulación. Además, permiten la inmovilización de compuestos biológicamente activos de diversas estructuras incluyendo fármacos cargados, moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular y biopolímeros. Una vez conformadas, estas formulaciones son utilizadas para fabricar agentes diversos como puntos cuánticos, colorantes y otros agentes de diagnóstico (5). Se ha reportado que las formulaciones de liberación de fármacos basadas en nanogeles mejoran la efectividad y la seguridad de ciertos medicamentos contra el cáncer y productos radiofarmacéuticos, ya que minimizan su entrega y los problemas de acumulación en tumores asociados con los agentes de medicina nuclear tradicional existentes, lo cual ha sido confirmado en estudios *in vivo* (6). Las aplicaciones biomédicas de estas nanopartículas en el área de diagnóstico y terapéutica de ciertas enfermedades, como el cáncer, continua en estudio. Sin embargo, la biocompatibilidad, la toxicidad y la capacidad de penetrar en las células son factores críticos que determinarán la utilidad de los nanogeles en aplicaciones clínicas. Por ello el objetivo de este trabajo es realizar una evaluación de la citotoxicidad de los nanogeles de PVP obtenidos por radiación gamma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la síntesis de los nanogeles poliméricos se utilizó el polímero PVP K-90 Kollidon® (BASF, Alemania) con una pureza de 99.99 %. Mediante análisis de viscosidad, se confirmó que el polímero se encontraba en condiciones óptimas. A partir de éste, se prepararon dos soluciones de 0.1% y 0.25% en agua desionizada ($\text{pH} = 8.6 \pm 0.05$ y $\eta = 2.6 \mu\text{S/cm} \pm 0.5$ % del valor medido). El porcentaje de PVP que presentaban las muestras fue de 0.1 % y 0.25 % y la dosis de irradiación empleada fue de 20 kGy. Luego de la preparación, se dejaron reposar

por un periodo de 12-24 horas. La síntesis se llevó a cabo en una instalación de irradiación autoblandada con fuente radioisotópica de ^{60}Co , homogeneidad 1,3 a temperatura ambiente, empleando una dosis de irradiación de 20 kGy. El proceso se controló mediante dosimetría de Fricke y filmica empleando dosímetros Perpex. El tiempo de irradiación fue de cuatro horas y se determinó mediante la plataforma de cálculo CalIPMA, desarrollada en el Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis del Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) (7). Después de irradiadas, las muestras fueron filtradas en membranas de $0.20\text{ }\mu\text{m}$ (NALGENETM, Thermo Scientific, Alemania). El análisis del tamaño promedio de los nanogeles se realizó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) (8), utilizando el equipo Malvern Nano Zetasizer que mide las fluctuaciones de intensidad de la luz dadas por dichas nanopartículas disueltas en agua. También se determinó el potencial ζ , el cual se define como la diferencia de potencial entre la capa estacionaria de fluido anexa a la partícula dispersada (capa de Stern) y el medio de dispersión (capa difusa de iones). Estos datos fueron analizados por triplicado mediante el programa informático Malvern Zetasizer versión 7.11, con el cual se determinó el tamaño promedio y la desviación estándar para cada muestra.

Las células de la línea L-929 tejido conectivo de ratón (INCQS 01-08, FIOCRUZ, Brasil), fueron cultivadas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (v:v) (SFB, Gibco). El cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 , hasta la formación de una monocapa confluyente de células (48 horas), luego fue colocado en placas de 96 pozos. Para ello se retiró el medio metabolizado, se lavó dos veces con 3 ml de PBS 1X y se tripsinizaron las células (0,5 ml de tripsina), esto se dejó incubar de 3-5 minutos a 37°C para desprender la monocapa. Después del tiempo de incubación se añadieron 3 ml de medio para suspender las células y neutralizar la tripsina. A partir de esta suspensión celular se realizaron las

diluciones 1:5 y 1:10 y azul tripán, para el conteo celular en la cámara de Neubauer. El cálculo de la suspensión celular de trabajo se llevó a cabo a través de la fórmula siguiente:

$$\text{células} \times \text{ml} = \frac{\text{Núm. De células totales vivas}}{4} \times 10^4 \times \text{dilución} \left(\frac{1}{5} \text{ ó } \frac{1}{10} \right)$$

De acuerdo con el resultado, se realizó el cálculo de los volúmenes de todos los reactivos a utilizar aplicando la ley de la volumetría para tener al final $200\text{ }\mu\text{l}$ por pozo. Se sembraron 6×10^4 células por pozo y se incubaron por 24 horas. Luego se añadieron los nanogeles de 30 y 90 nm a concentraciones de 50, 100, 200 y $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ utilizando como control células con medio y como blanco PBS 1X. Se utilizaron 6 pozos para cada condición en tres experimentos independientes. Se incubaron las placas por 24 y 48 horas. Para medir la viabilidad celular se utilizó el ensayo de captación de rojo neutro (9). En éste, se consideró que el rojo neutro al ser un colorante iónico débil penetra a las células a través de las membranas por difusión pasiva y es almacenado en los lisosomas. En este caso, independientemente de su mecanismo de acción, si el compuesto que se evalúa interfiere en el proceso de división y multiplicación celular se reducirá el número de células del cultivo lo que podrá ser detectado al determinar la cantidad del colorante retenido por las células vivas (10). Para realizar el ensayo de captación de rojo neutro, primero las células se lavaron dos veces con $150\text{ }\mu\text{l}$ de PBS 1X se añadieron $100\text{ }\mu\text{l}$ de rojo neutro (SIGMA-ALDRICH, USA) y se incubaron por 2 horas a 37°C y 5 % de CO_2 . Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con $150\text{ }\mu\text{l}$ de PBS 1X. Por último, se añadió la solución para desteñir preparada con 10 ml de etanol al 96 %, 10 ml de H_2O estéril y $200\text{ }\mu\text{l}$ de ácido acético glacial (Merck, Alemania). La densidad óptica fue medida en un lector de placas de ELISA a 490 nm (11), utilizando el programa Gen 5. Los análisis estadísticos de la viabilidad celular se realizaron con el programa *GraphPad* versión 6.00 para Windows (Prism, San Diego, CA, EEUU). Para todos los casos se analizaron los requisitos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Teniendo

en cuenta el diseño experimental para comparar las diferencias estadísticas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación doble y modelo agrupado con una prueba de Bonferroni a posteriori. El nivel de significancia empleado fue $p < 0,05$

RESULTADOS

Entre las diversas técnicas que se utilizan para la caracterización del tamaño de partículas incluyendo nanogeles, una de las más frecuentes es la DLS. Luego de realizado este análisis, el resultado mostró que el tamaño promedio para cada una de las partículas analizadas fue de 30 y 90 nm, esto se demostró a través de la presencia de un pico de intensidad definido para cada uno de estos valores que además presentaban poca variación y fueron estables en el tiempo.

el cuadro 1 se muestran los valores de tamaño de partículas y potencial ζ , con sus respectivas desviaciones estándares para ambas muestras.

Cuadro 1. Valores promedios de tamaño de partícula de los nanogeles y potencial ζ

Muestra	Tamaño promedio (nm)	Potencial ζ , (mV)
A (Nanogel 30 nm)	27.52 (0.39)	-20.86 (0.39)
B (Nanogel 90 nm)	87.03 (1.58)	-15.63 (1.58)

Al analizar los resultados a 24 y 48 horas y al comparar con el grupo control mediante la prueba ANOVA de dos vías con límite de confianza del 95 %, los resultados mostraron que a las 24 horas los nanogeles tanto de 30 como de 90 nm no presentaron

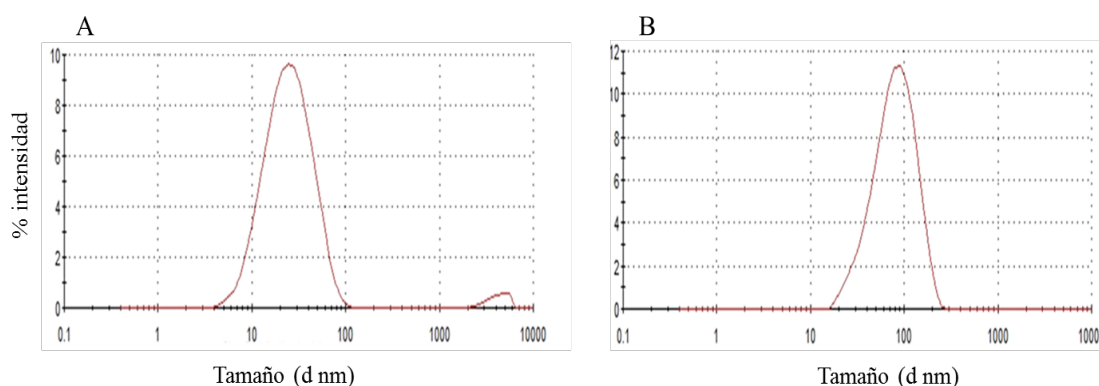


Figura 1. Gráfico de porcentaje intensidad contra tamaño promedio de los nanogeles a dosis de irradiación de 20 kGy, A) 0.1 % PVP y B) 0.25 % PVP.

Con el objetivo de evaluar la carga superficial y la estabilidad de los nanogeles en medio acuoso, se determinó el potencial ζ . Este parámetro indica la afinidad electrostática de las partículas con el solvente y su capacidad de dispersión. Un elevado valor modular de potencial ζ (generalmente >30 y < -30) se asocia con una elevada estabilidad de las partículas en solución acuosa. El signo de dicho potencial presenta una relación directa con la carga neta superficial de las muestras.

En la figura 1 se muestra el porcentaje de intensidad contra tamaño de partícula, de los nanogeles obtenidos a dosis de irradiación de 20 kGy. En

efectos citotóxicos (Figura 2). Cuando la viabilidad relativa de las células para la concentración más alta del extracto de la muestra (extracto 100 %) es > 70 % de la del grupo control, entonces el material se debe considerar no citotóxico. En el presente estudio el menor porcentaje de sobrevivencia en 24 horas fue de 82 % para los nanogeles de 30 nm y 71 % para los de 90 nm. A las 48 horas se observó cierta citotoxicidad en los nanogeles de 90 nm ya que en todas las concentraciones el porcentaje de sobrevivencia fue menor al 70 %. Los nanogeles de 30 nm tuvieron un resultado similar al de 24 horas.

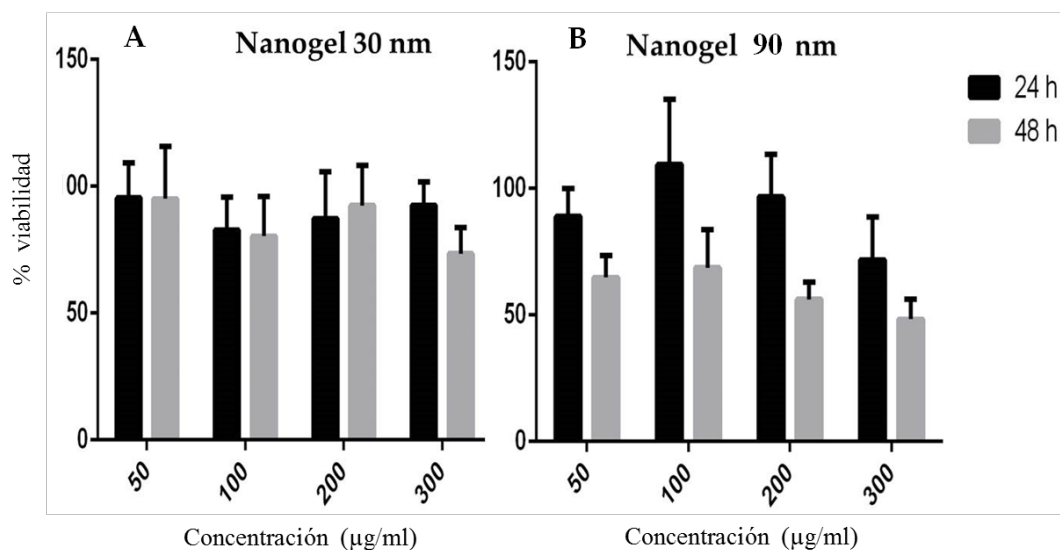


Figura 2. Comportamiento del porcentaje de viabilidad celular bajo el efecto de ambos nanogeles (A) 30 nm y (B) 90 nm en la línea celular L-929 a las 24 y 48 horas.

DISCUSIÓN

La caracterización físicoquímica DLS permitió confirmar la síntesis de nanogeles con tamaños promedios de 30 y 90 nm aproximadamente. Estudios han demostrado que nanopartículas de hasta 200 nm son primariamente asimiladas por endocitosis y que partículas de 50 nm son más rápidamente asimiladas cuando se compara con aquellas de menor (<14 nm) y mayor tamaño (hasta 500 nm) (12-17). Por tanto, los de los nanogeles obtenidos se encuentran dentro del rango óptimo para la entrada a las células, lo cual facilitaría la efectividad y seguridad de ciertos fármacos con acción intracelular.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del potencial ζ evidencian que la carga superficial neta de ambas nanopartículas es negativa. Lo anterior puede estar dado por la adición de radicales OH a la estructura del polímero durante el proceso de reticulación. Estos grupos funcionales tienen cierto carácter ácido y al desprotonarse pueden concederle una ligera carga superficial negativa al nanogel (18). A pesar de los bajos valores modulares del potencial ζ , los nanogeles de PVP son lo suficientemente afines con el medio acuoso y se mantuvieron estables en el tiempo.

La viabilidad celular fue evaluada mediante integridad lisosomal. La estabilidad de las membranas lisosomales se determina por el tiempo de retención del rojo neutro, a menor absorbancia, menor es la integridad lisosomal y esto es medida de la disminución de la viabilidad celular. En el caso de los nanogeles de 30 nm no hubo efecto citotóxico para ninguna de las concentraciones empleadas a las 24 y 48 h. Por lo tanto, estos resultados demuestran que los nanogeles de 30 nm son candidatos potenciales para ser empleados como sistemas de transporte de fármaco. Estudios in vivo y de funcionalidad deben realizarse para complementar estos resultados. Los nanogeles de 90 nm serán evaluados con otros ensayos de viabilidad celular de principios diferentes, así como el empleo de otras líneas celulares, para comprobar los posibles efectos a las 48 h.

CONCLUSIÓN

Los nanogeles de PVP obtenidos por radiación gamma presentaron un tamaño promedio de 30 y 90 nm. Los resultados demostraron que no existen efectos citotóxicos en células tratadas con los nanogeles de 30 nm a las concentraciones de 50, 100, 200 y 300 µg/ml durante 24 horas y 48 horas.

Sin embargo, los nanogeles de 90 nm a las 48 horas presentaron cierta citotoxicidad al disminuir el porcentaje de sobrevivencia a menos de 70%, no así a las 24 horas. La ausencia de citotoxicidad de los nanogeles de 30 nm sobre la línea celular L-929 los convierte en candidatos potenciales para el transporte de fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Carmen Fernández por las valiosas sugerencias y la revisión crítica del documento, y a Aymara Zamora, Meilin Sánchez y la Dra. Diana Hernández por la asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Hervella P, Lozano V, García-Fuentes M, Alonso MJ. Nanomedicine: New challenges and opportunities in cancer therapy. *J Biomed Nanotechnol*. 2008 Sep; 4(3): 276-292. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2008.339>
- Hasirci, N. Micro and nano systems in biomedicine in drug delivery. In: Mozafari MR. *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*. Dordrecht: Springer; 2007. P. 1-26. <https://www.springer.com/la/book/9781402062889>
- Rosiak JM. Nano-and microgels of poly (vinyl methyl ether) obtained by radiation techniques. In: *Emerging applications of radiation in nanotechnology proceeding of a consultants meeting held in Bologna, Italy*, 22-25 March 2004. P. 141-156. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1438_web.pdf
- Escalona RO, Quintanar GD. Nanogeles poliméricos: una alternativa para la administración de fármacos. *Rev Mex Cienc Farm*. 2014 Jul-Sep; 45(3): 17-38. www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v45n3/v45n3a3.pdf
- Zarekar NS, Lingayat VJ, Pande VV. Nanogel as a novel platform for smart drug delivery system. *Nanosci Nanotechnol Res*. 2017 Mar; 4(1): 25-31. DOI: 10.12691/nnr-4-1-4
- Sultana F, Manirujjaman IUH, Arafat M, Sharmin S. An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci* 2013 Sep; 3(8 Suppl 1): S95-S105. DOI: 10.7324/JAPS.2013.38.S15
- Ges NAA, Viltres CH, Fonseca RD, Rapado PM, Aguilera CY. Radiation-induced synthesis of polyvinylpyrrolidone (PVP) nanogels. *J Phys Sci Appl*. 2016 Sep-Oct; 6(5): 21-26. DOI: 10.17265/2159-5348/2016.05.004
- Pecora R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J Nanopart Res* 2000 Feb; 2: 123-131. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A109067107182.pdf>
- Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008 Jul; 3(7): 1125-1131. DOI:10.1038/nprot.2008.75
- O' Hare S, Atterwill CK. *Methods in molecular biology in vitro toxicity testing protocols*. New Jersey USA: Humana Press Inc. Totowa. 1995. P. 332. <http://link.springer.com/content/pdf/10.1385%2F0896032825.pdf>
- Mullick CS, Lalwani G, Zhang K, Yang JY, Neville K, Sitharaman B. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*. 2013 Oct; 34(1): 283-293. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.057
- Batalla MJ, Cuadros MA, San Martín-Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat Am J Phys Educ*. 2014 Dec; 8(4): 4319-14319-6. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5196753>
- Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985 Feb-Mar; 24(2): 119-124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006 Apr; 6(4): 662-668. DOI: 10.1021/nl052396o
- Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*. 2007 Jun; 7(6): 1542-1550. DOI: 10.1021/nl070363y
- Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Aug; 105(33): 11613-11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004 Jan; 377(1): 159-169. DOI: 10.1042/bj20031253
- Zhu, X., P. Lu, W. Chen y J. Dong. Studies of UV crosslinked poly (N-vinylpyrrolidone) hydrogels by FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopies. *Polymer*. 2010 Jun; 51(14): 3054-3063. DOI: [10.1016/j.polymer.2010.05.006](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.05.006)