

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico Biológicas



Evaluación de la actividad citotóxica de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina, en dos líneas celulares de cáncer de mama

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la
estudiante

Lourdes Grisell Cordova Frago

152802

Licenciatura en Bioquímica Clínica

Director: Miguel Ángel Méndez Rojas

Co-directora: Jessica Andrea Flood Garibay

San Andrés Cholula, Puebla.

Otoño 2020.

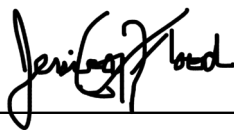
Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la
estudiante **Lourdes Grisell Cordova Frago, 152802.**

Director de Tesis



Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas

Co-directora de Tesis



M. en C. Jessica Andrea Flood Garibay

Presidenta de Tesis



Dra. Irene Vergara Bahena

Secretaria de Tesis



Dra. Lucila Isabel Castro Pastrana

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Méndez, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación.

A la M. en C. Jessica Flood, por enseñarme todo lo relacionado con el cultivo celular, así como por guiarme y apoyarme a lo largo de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de cultivo celular, en particular a Natalia Pérez, Melissa Solís y Ernesto Guevara.

A mis amigos, quienes también han sido partícipes de mi dedicación a este proyecto y que me han alentado y ayudado a seguir adelante con el mismo.

A todos mis profesores de la universidad, de quienes he aprendido mucho y, particularmente, a la Dra. Laura Plá, la Dra. Lucila Castro, la Dra. Jessica Mundo y al Dr. José Luis. Gracias por aconsejarme y guiarme.

Muy especialmente a mis papás y a mi hermana, quienes me han brindado su apoyo y amor incondicional, y sin los cuales no habría logrado esta meta. Muchas gracias por siempre estar a mi lado e impulsarme a seguir mis sueños.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
DEFINICIÓN DEL CÁNCER	7
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER	7
CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER.....	8
DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	9
ANATOMÍA DE LA MAMA.....	10
TIPOS DE CÁNCER DE MAMA	10
SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA	11
ESTADIOS DEL CÁNCER DE MAMA	12
NANOTECNOLOGÍA	15
NANOMEDICINA	15
ANTECEDENTES.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
LÍNEAS CELULARES.....	23
OTROS MATERIALES.....	23
FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL CON CURCUMINA	24
CARACTERIZACIÓN	24

ENSAYOS DE MTT	24
MAGNETITA	25
SISTEMA MAGNETITA-CURCUMINA	27
CURCUMINA	27
MTT DE MDA-MB-231	29
MTT DE MCF-7	29
MTT DE MS-5	29
RESULTADOS	31
CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	31
<i>FTIR</i>	31
<i>DLS</i>	32
<i>TGA</i>	33
<i>SEM</i>	35
ENSAYOS DE MTT	37
<i>MDA-MB-231</i>	37
<i>MCF-7</i>	41
<i>MS-5</i>	44
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AP-1: proteína activadora 1, por sus siglas en inglés

ATCC: del inglés *American Type Culture Collection*

BP-2: proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 2, por sus siglas en inglés

BP-4: proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 4, por sus siglas en inglés

BP-5: proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 5, por sus siglas en inglés

BRCA1: gen de cáncer de mama 1, del inglés *breast cancer gene 1*

BRCA2: gen de cáncer de mama 2, del inglés *breast cancer gene 2*

cm: centímetros

cm⁻¹: centímetros a la menos 1, unidad de longitud de onda.

COVID-19: Enfermedad por el coronavirus 2019, por sus siglas en inglés

CXCL1: ligando 1 de la quimiocina con motivo CXC, por sus siglas en inglés

CXCL2: ligando 2 de la quimiocina con motivo CXC, por sus siglas en inglés

DDT: diclorodifeniltricloroetano, por sus siglas en inglés

DLS: Dispersión Dinámica de Luz, por sus siglas en inglés

DMSO: dimetilsulfóxido, por sus siglas en inglés

DNA: Ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés.

DTA: análisis térmico diferencial, por sus siglas en inglés

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés

EGF: factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés

ERKs: cinasas reguladas por señales extracelulares, por sus siglas en inglés

FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier, por sus siglas en inglés

GLOBOCAN: del inglés *Global Cancer Observatory*

h: horas

HEPES: n-(2-hidroxietil) piperazina-n-(2-ácido etanosulfónico)

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, por sus siglas en inglés.

IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina, por sus siglas en inglés

ILC: carcinoma lobular infiltrante o invasivo, por sus siglas en inglés

INSP: Instituto Nacional de Salud Pública

JAK: Cínasa de Janus, por sus siglas en inglés

Ki-67: marcador de proliferación celular Ki-67.

LCIS: carcinoma lobular *in situ*, por sus siglas en inglés

mg: miligramo

ml: mililitro

MTT: colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, por sus siglas en inglés

nm: nanómetro

NNI: del inglés *National Nanotechnology Initiative*.

°C: grados Celsius

P53: proteína supresora de tumores p53.

PBS: buffer fosfato salino, por sus siglas en inglés

pH: potencial de hidrógeno

ppm: partes por millón

ROS: especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés.

SDS: dodecilsulfato sódico, por sus siglas en inglés

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido, por sus siglas en inglés

SPIONs: nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, por sus siglas en inglés

STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3, por sus siglas en inglés

TGA: análisis termogravimétrico, por sus siglas en inglés

TGF- α : factor de crecimiento transformante alfa, por sus siglas en inglés

TNF: factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés

UV: radiación ultravioleta

UVB: radiación ultravioleta B.

VPH-16: virus del Papiloma Humano tipo 16.

WHO: Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés

WNT7B: miembro 7B de la familia de genes Wnt

μ l: microlitro.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Anatomía de la mama (tomada de la CDC, 2018).
- Figura 2. Estadios del cáncer de mama (tomada de Suárez & Salvador, 2019).
- Figura 3. Estructura química de la curcumina (tomada de Wang et al., 2016).
- Figura 4. Blancos moleculares de la curcumina implicados en el estrés oxidativo (ROS por sus siglas en inglés), proliferación, apoptosis y arresto del ciclo celular (tomada de Wang et al., 2016).
- Figura 5. Fundamento del ensayo de MTT (adaptada de Kuete et al., 2017).
- Figura 6. Espectro Infrarrojo comparativo de la curcumina, las nanopartículas de magnetita y las nanopartículas de magnetita con curcumina.
- Figura 7. DLS del sistema magnetita-curcumina.
- Figura 8. Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de la curcumina.
- Figura 9. Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de la magnetita.
- Figura 10. Termogravimetría (TG) del sistema magnetita-curcumina
- Figura 11. Análisis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por SEM.
- Figura 12. Análisis por SEM del sistema magnetita-curcumina.
- Figura 13. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de magnetita (Fe_3O_4).
- Figura 14. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.
- Figura 15. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.
- Figura 16. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina.
- Figura 17. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 2, después de ser tratadas con 21 diferentes concentraciones de curcumina.
- Figura 18. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.
- Figura 19. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.
- Figura 20. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina.
- Figura 21. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina.

Figura 22. Viabilidad celular de células MS-5 después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de magnetita (Fe_3O_4).

Figura 23. Viabilidad celular de células MS-5 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.

Figura 24. Viabilidad celular de células MS-5 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe_3O_4 -curcumina.

Figura 25. Viabilidad celular de células MS-5, después de ser tratadas con 23 diferentes concentraciones de curcumina.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terapia farmacológica actual para el cáncer de mama, basada en sus subtipos moleculares (adaptada de Wu et al., 2017).

Tabla 2. Preparación de medios de cultivo para cada línea celular utilizada.

Tabla 3. Preparación de soluciones de Fe_3O_4 y Fe_3O_4 -curcumina para ensayos de MTT con 24 concentraciones diferentes.

Tabla 4. Preparación de soluciones de curcumina y doxorubicina para ensayos de MTT con 24 concentraciones diferentes.

Tabla 5. Resultados de viabilidad celular de MDA-MB-231 a las 24 h, determinados por MTT.

Tabla 6. Resultados de viabilidad celular de MCF-7 a las 24 h, determinados por MTT.

Tabla 7. Resultados de viabilidad celular de MS-5 a las 24 h, determinados por MTT.

RESUMEN

El cáncer de mama constituye un problema de salud a nivel mundial, siendo la primera causa de defunciones por cáncer en mujeres. Tan solo en México, en el 2018 tuvo una incidencia del 14.3% y una tasa de mortalidad del 8.2% (WHO, 2020), mientras que actualmente representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Los tratamientos disponibles son invasivos, inespecíficos y con un alto riesgo de causar efectos adversos; además de que las células cancerosas están adquiriendo quimiorresistencia. Debido a esto, la presente investigación plantea el uso de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina como una potencial alternativa terapéutica para el cáncer de mama, puesto que otros estudios han demostrado la actividad citotóxica de la magnetita y la curcumina de manera independiente. El sistema magnetita-curcumina fue caracterizado por FTIR, TGA/DTA, DLS y SEM; evaluándose su efecto citotóxico a las 24 horas mediante ensayos de MTT en células MDA-MB-231, MCF-7 y MS-5, en comparación con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y curcumina sola. Los resultados denotaron una correcta funcionalización de las nanopartículas de magnetita con la curcumina, siendo su efecto citotóxico mayor en células MCF-7, aunque en general fue mínimo para ambas líneas celulares de cáncer de mama. Además, presentó un efecto citotóxico en MS-5, indicando su falta de especificidad por las células cancerosas, mismo que podría solucionarse por modificación superficial del sistema. En conclusión, estos resultados resaltan el efecto anticancerígeno del sistema magnetita-curcumina en cáncer de mama, aunque se necesita mayor investigación para determinar con certeza su efecto citotóxico en esta patología.

Palabras clave: sistema magnetita-curcumina, nanopartículas de magnetita, curcumina, cáncer de mama.

INTRODUCCIÓN

Definición del Cáncer

El cáncer se puede definir como una condición clínica que involucra muchas enfermedades y que se caracteriza por el crecimiento no controlado de las células, mismo que resulta en la presencia de uno o más tumores (Weinberg, 2014). El cáncer es considerado una enfermedad genética debido a que surge a partir de lesiones en el DNA, las cuales convierten a la célula en una célula pre-cancerosa; no obstante, para que el cáncer se desarrolle es necesario que se presente más de una mutación. Al respecto, el modelo de multipasos para la carcinogénesis de Fearon y Vogelstein describe este proceso como una serie de alteraciones genéticas que se acumulan de manera más o menos escalonada por selección natural, de tal forma que las clonas emergen secuencialmente, teniendo cada una de ellas ventajas de crecimiento sobre la clona precedente y, por lo tanto, eventualmente evolucionan hacia cáncer (Pelengaris & Khan, 2013, p. 29). Estas ventajas se refieren a mutaciones que comprometen la regulación de la proliferación celular, la sobrevivencia, diferenciación, migración, así como interacciones con las células vecinas y el estroma; todo lo cual permite la progresión tumoral (Pelengaris & Khan, 2013).

Etiología del Cáncer

El cáncer puede ser causado por agentes exógenos o endógenos. Estos agentes pueden afectar genes relacionados con la proliferación celular y la migración celular, e incluso podrían favorecer selectivamente el crecimiento de células tumorales o de sus precursores (Pelengaris & Khan, 2013). Los carcinógenos exógenos se clasifican como: químicos, físicos o biológicos. El primer grupo incluye compuestos inorgánicos como el níquel y el arsénico, compuestos orgánicos como las nitrosaminas (asociadas a cáncer de estómago), algunos medicamentos como la ciclofosfamida, hormonas y compuestos similares a estas, así como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Los carcinógenos físicos consisten en radiación ultravioleta (específicamente la UVB) y radiación ionizante; mientras que los carcinógenos biológicos involucran al virus del Papiloma Humano (VPH-16), el virus de Epstein-Barr, el virus de la Hepatitis B, *Helicobacter pylori* (asociada a cáncer de estómago) y *Schistosoma mansoni* (relacionada con cáncer de vejiga) (Schulz, 2005).

Aunado a esto, factores del estilo de vida como la dieta, la inactividad física (la cual podría ser responsable del 11% de los casos de cáncer de mama) y la vida reproductiva, también desempeñan un papel importante como causas de mutaciones cancerígenas (Pecorino, 2016). Por otro lado, los procesos endógenos igualmente pueden contribuir al desarrollo del cáncer ya sea por sí mismos o por su interacción con procesos exógenos. Los procesos endógenos se refieren a errores durante la replicación del DNA, reacciones metabólicas que producen ROS, e inflamación crónica (Schulz, 2005).

Todos estos procesos pueden llevar al desarrollo de mutaciones y, por ende, desencadenar el cáncer. Además, cabe mencionar que el cáncer también puede ser causado por mutaciones germinales puesto que estas conllevan a la predisposición del cáncer hereditario; sin embargo, únicamente del 5 al 10% de los casos de cáncer son hereditarios. En este sentido, se estima que más del 1% de todos los genes humanos son genes cancerosos, de los cuales aproximadamente el 90% presenta mutaciones somáticas que dan origen a tumores esporádicos; mientras que el 20% presenta mutaciones germinales y 10% muestra ambos tipos de mutaciones (Pelengaris & Khan, 2013).

Características del cáncer

Como se mencionó anteriormente, la adquisición de determinadas lesiones en el DNA facilita la progresión tumoral. Estas alteraciones genéticas confieren al cáncer las características que lo identifican como tal, las cuales son: autonomía en la señalización del crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la respuesta inmunitaria, potencial replicativo ilimitado, evasión de la apoptosis, invasión tisular y metástasis, angiogénesis sostenida, inestabilidad genómica, inflamación promotora de tumores y reprogramación del metabolismo energético (Weinberg, 2014; Pecorino, 2016).

Las alteraciones genéticas que le confieren estas características al cáncer involucran a tres principales clases de genes: oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del DNA o también llamados “caretakers”. Los oncogenes están sujetos a mutaciones de ganancia de función, amplificación o sobreexpresión; mientras que los genes supresores de tumores y los “caretakers” pueden sufrir mutaciones de pérdida de función, deleciones o silenciamiento epigenético (Pelengaris & Khan, 2013).

Definición y etiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad genética en la cual las células de la mama se multiplican sin control, dando lugar a uno o más tumores malignos (breastcancer.org, 2018; CDC, 2018). A pesar de esto, únicamente el 5 al 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios. Algunas pacientes pueden heredar mutaciones en los genes P53, BRCA1 y BRCA2, los cuales se han asociado con la exposición a estrógenos y al subsecuente desarrollo de cáncer de mama. Asimismo, pacientes con una historia familiar de cáncer de mama o de ovario tienen mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Mientras que el 85 al 90% de los casos se deben a anomalías a nivel genético que ocurren como resultado del proceso normal de envejecimiento a lo largo de la vida (Akram et al., 2017; breastcancer.org, 2018).

Además de las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 (entre otros genes), así como antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario, existen otros factores de riesgo que predisponen a una mujer al desarrollo de cáncer de mama. Entre estos se encuentran:

- 1) Menarca antes de los 12 años y comienzo de la menopausia después de los 55 años, puesto que esto implica una mayor exposición hormonal.
- 2) Tener el primer embarazo después de los 30 años de edad, no amamantar, nunca tener un embarazo de término.
- 3) Presentar mamas densas (mayor tejido fibroso y glandular que adiposo).
- 4) Antecedentes personales de cáncer de mama o enfermedades de las mamas no cancerosas como hiperplasia atípica, radioterapia previa en las mamas antes de los 30 años.
- 5) Envejecimiento, ya que a mayor edad el riesgo de cáncer de mama se incrementa.
- 6) Sobrepeso u obesidad, sobre todo después de la menopausia.
- 7) Tomar por más de cinco años terapias de reemplazo hormonal que contengan estrógeno y progesterona o algunos anticonceptivos orales.
- 8) Exposición a estrógenos en el ambiente (pesticidas como el DDT u hormonas presentes en la carne).
- 9) Elevado consumo de alcohol (CDC, 2018; breastcancer.org, 2018).

Anatomía de la mama

Las mamas están conformadas por tres partes principales: lobulillos o lóbulos, conductos y tejido conectivo (Figura 1). Los primeros son las glándulas que producen la leche, los segundos son los túbulos a través de los cuales la leche es transportada hacia el pezón; mientras que el tejido conectivo, mismo que consiste en tejido fibroso y adiposo, es el encargado de rodear y sostener todos los componentes de la mama; es decir, constituye el estroma (CDC, 2018).

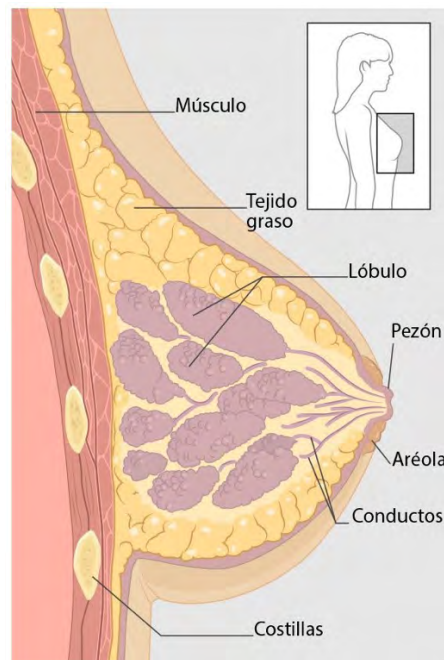


Figura 1. Anatomía de la mama (tomada de la CDC, 2018).

Tipos de cáncer de mama

El tipo de cáncer de mama depende del tipo de células de la mama en las cuales se origina el tumor maligno o que se vuelven cancerosas (CDC, 2018). De manera general, también se puede clasificar en invasivo o no invasivo (Akram et al., 2017).

Carcinoma lobular

Es aquel que se origina en los lobulillos de la mama y existen dos tipos: el carcinoma lobular *in situ* (LCIS por sus siglas en inglés) y el carcinoma lobular infiltrante (ILC por sus siglas en inglés). El LCIS se desarrolla en los lobulillos de la mama, pero no se extiende más allá

de estos en el tejido mamario; por lo que, se le considera no invasivo. Mientras que el ILC es aquel que ya se ha extendido a otras áreas del cuerpo (Akram et al., 2017).

Carcinoma ductal in situ

Es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo, el cual está limitado a los conductos de la mama (Akram et al., 2017).

Carcinoma ductal invasivo

La mayoría de los casos de cáncer de mama corresponden al carcinoma ductal invasivo o infiltrante. Este se origina en los conductos que transportan la leche en la mama y se extiende hacia la pared de estos conductos, invadiendo el tejido adiposo de la mama y probablemente otras partes del cuerpo (metástasis) (Akram et al., 2017; Wu et al., 2017). Existen varios subtipos de este tipo de cáncer invasivo, los cuales incluyen: carcinoma medular, el cual representa del 3 al 5% de los casos de cáncer de mama y cuyo nombre hace referencia a un tumor que consiste en una masa suave y pulposa que se asemeja a la médula o bulbo raquídeo del cerebro; carcinoma mucinoso o coloideo, mismo en el que el tumor es conformado a partir de células anómalas que “flotan” en agrupaciones o cúmulos de mucina; carcinoma tubular, en donde el tumor suele ser pequeño y estar constituido por células con forma de tubo que son de bajo grado; es decir, que poseen una apariencia similar a la de las células sanas y que generalmente crecen lentamente (breastcancer.org, 2018).

Cáncer de mama inflamatorio

Es una forma agresiva, aunque poco frecuente en la población general; es más común en las mujeres africanas. Generalmente inicia con el enrojecimiento e inflamación de la mama en vez del bulto característico del cáncer de mama. Este tipo de cáncer se multiplica y propaga velozmente, teniendo que sus síntomas pueden empeorar en tan solo unos días e incluso horas (breastcancer.org, 2018).

Subtipos moleculares del cáncer de mama

Ahora bien, existe otra clasificación del cáncer de mama, la cual se basa en los genes que el cáncer exprese y se les conocen como subtipos moleculares.

Luminal A

Esta forma es positiva para los receptores de estrógeno y de progesterona, pero negativo a HER2 (Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, por sus siglas en inglés), además de tener bajos niveles de la proteína Ki-67, la cual ayuda a controlar la velocidad de crecimiento de las células cancerosas y es un marcador de proliferación celular. Este tipo de cáncer es de bajo grado ya que crece lentamente y es el que tiene el mejor pronóstico (breastcancer.org, 2018).

Luminal B

Esta forma es positiva para los receptores de estrógenos y progesterona y puede ser positivo o negativo a HER2, además de tener altos niveles de Ki-67. Este tipo de tumores crece un poco más rápido que el cáncer luminal A; por lo que, su pronóstico es menos prometedor (breastcancer.org, 2018).

HER2-enriquecido

Esta forma es negativa para los receptores de estrógenos y progesterona, aunque es positiva para HER2. Este tipo de tumores crece más rápido que las formas luminarias y puede tener un peor pronóstico; sin embargo, existen terapias dirigidas como el trastuzumab (un anticuerpo monoclonal anti-HER2), que pueden tratarla de manera exitosa (Wu et al., 2017; breastcancer.org, 2018).

Cáncer de mama triple negativo

Es una forma del cáncer de mama que es negativa para los receptores de estrógenos, los receptores de progesterona y para HER2. Este tipo de cáncer representa del 15 al 20% de los casos de cáncer de mama y es más común en mujeres con mutaciones en el gen BRCA1 (el cual está involucrado en la reparación del DNA); así como en mujeres jóvenes y africanas, y en mujeres premenopáusicas (Akram et al., 2017; Wu et al., 2017; breastcancer.org, 2018).

Estadios del cáncer de mama

De acuerdo con breastcancer.org (2018), los estadios del cáncer de mama se basan en el tamaño y tipo de tumor, el grado tumoral, el cual es una medida que indica qué tanto se

parecen las células cancerosas a las células normales y su patrón de crecimiento (puede ser: grado 1 o bajo, grado 2 o intermedio y grado 3 o alto, siendo este último indicativo de que las células cancerosas crecen rápidamente y ya no se parecen a las células normales); el nivel de penetración de las células tumorales en el tejido mamario, en si presentan receptores para estrógeno y progesterona, así como en su producción de la proteína HER2. En este sentido, el estadio 0 es el cáncer no invasivo y el resto de los estadios corresponden a diferentes categorías de las formas invasivas del cáncer de mama (Akram et al., 2017; breastcancer.org, 2018). La Figura 2 ilustra los diferentes estadios del cáncer de mama.

Estadio 0

Describe a los tipos de cáncer de mama no invasivos. En esta etapa no hay evidencia de células cancerosas o células anormales no cancerosas que estén fuera del sitio en donde se originó el cáncer, o invadiendo tejido normal sano (Akram et al., 2017).

Estadio I

Describe el cáncer de mama invasivo en el cual las células cancerosas ya se encuentran invadiendo tejido mamario circundante normal; y se divide en dos subcategorías: IA, la cual se refiere a que el tumor mide hasta 2 centímetros, así como que no se ha propagado fuera del tejido mamario; es decir, los nódulos linfáticos aún no están involucrados. La segunda subcategoría es IB, misma que hace referencia a dos posibles escenarios: 1) cuando hay un tumor en la mama que no supera los 2 cm y existen pequeños grupos de células cancerosas (de entre 0.2 mm y 2 mm) presentes en los nódulos linfáticos, o 2) cuando no hay un tumor en la mama, pero existen pequeños grupos de células cancerosas (de entre 0.2 mm y 2 mm) en los nódulos linfáticos (Akram et al., 2017).

Adicionalmente, cabe mencionar que, si el cáncer de mama es positivo a receptores de estrógeno, positivo o negativo a receptores de progesterona, negativo a receptores de HER2 y/o no se ha esparcido a los nódulos linfáticos; es probable que este sea catalogado como estadio IA. Por otro lado, si se trata de un tumor de más de 5 cm presente en 4 a 9 nódulos linfáticos axilares, el cual es de grado 2 y que además es positivo para HER2 y para receptores de estrógeno, progesterona, este se clasificaría como IB (breastcancer.org, 2018).

Estadio II

Se divide en dos subcategorías, ambas en referencia al cáncer invasivo: IIA, la cual describe al tumor encontrado en los nódulos linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos centinela, más no en el tejido mamario. Además, el tumor puede ser mayor o menor de 2 cm, pero no superior a los 5 cm. Mientras que la subcategoría IIB indica un tumor cuyo tamaño puede ser mayor a los 5 cm, sin embargo, este no puede alcanzar los nódulos linfáticos axilares (Akram et al., 2017).

Aunado a lo anterior, si el tumor es grado 3, se encuentra en 4 a 9 nódulos linfáticos axilares y, además es positivo a HER2 y a los receptores de estrógeno y progesterona; este sería clasificado como IIA (breastcancer.org, 2018).

Estadio III

Se subdivide en tres categorías de cáncer de mama invasivo, teniendo que la IIIA se refiere a que el cáncer se encuentra en 4 a 9 nódulos linfáticos axilares o en los nódulos centinela, aunque no hay ningún tumor en el tejido mamario; la IIIB indica un tumor de cualquier tamaño pero que ha causado inflamación o úlceras en la piel de las mamas y, además, que puede haberse propagado hasta 9 nódulos linfáticos axilares o a nódulos linfáticos centinela. Mientras que la categoría IIIC describe la metástasis del tumor en 10 o incluso más nódulos linfáticos axilares, incluyendo aquellos que se encuentran por arriba y por debajo de las clavículas (Akram et al., 2017).

Además, si el tumor es grado 2, positivo o negativo a HER2 y positivo a los receptores de estrógeno y de progesterona, se trataría de un cáncer tipo IIIA (breastcancer.org, 2018).

Estadio IV

Es la forma avanzada y metastásica del cáncer de mama, en la cual este se ha esparcido a otros órganos del cuerpo como pulmones, hueso, hígado, cerebro, entre otros (Akram et al., 2017; breastcancer.org, 2018).

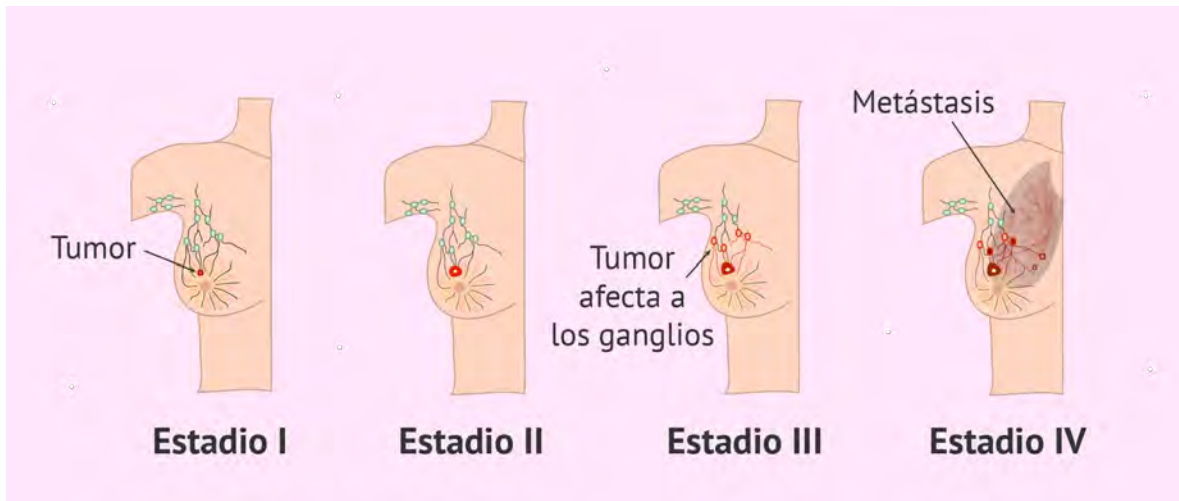


Figura 2. Estadios del cáncer de mama (tomada de Suárez & Salvador, 2019).

Nanotecnología

La Nanotecnología es definida por la *National Nanotechnology Initiative* (NNI por sus siglas en inglés) como “la ciencia, ingeniería y tecnología conducidas a la escala nanométrica (1 a 100 nm), en donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas en una amplia variedad de campos, los cuales incluyen química, física, biología, medicina y electrónica” (Bayda et al., 2020, p. 2). Es decir, hace referencia a la capacidad de convertir o manipular estructuras al controlar su forma y tamaño en la escala nanométrica, aprovechando sus propiedades a esta escala para su aplicación en las áreas antes enunciadas (Bayda et al., 2020).

Nanomedicina

La Nanomedicina se refiere a la aplicación biomédica de materiales con al menos una dimensión por debajo de los 100 nm, aunque existen algunos dispositivos de entre 100 y 200 nm que generalmente en la práctica también se consideran como nanomedicina. Ejemplos de nanomedicina incluyen: liposomas, nanopartículas, micelas, dendrímeros, nanotubos, entre otras; mismas que pueden ser elaboradas a partir de diversos materiales como son: los lípidos, fosfolípidos, polímeros, proteínas, materiales inorgánicos o una combinación de los anteriores. Algunos de estos nanomateriales ya están siendo implementados en el tratamiento del cáncer de mama, por ejemplo: Doxil[®], el cual es una formulación liposomal pegilada de doxorubicina y Abraxane[®], mismo que consiste en paclitaxel unido a albúmina humana en forma de nanopartículas (Wu et al., 2017).

ANTECEDENTES

De acuerdo con el GLOBOCAN 2018, el cáncer de mama representó el 11.6% de los nuevos casos de cáncer y el 6.6% de las muertes reportadas en ambos sexos y todas las edades durante el 2018 a nivel mundial. No obstante, el cáncer de mama sigue manteniéndose como la principal causa de muerte debida a cáncer en mujeres alrededor del mundo, incluido México (Akram et al., 2017; INSP, 2020).

Actualmente, el tratamiento del cáncer de mama incluye las modalidades estándar como la cirugía, la radioterapia y el tratamiento farmacológico. Las primeras dos modalidades están encaminadas a la erradicación tanto del tumor primario en el tejido mamario, como de aquellas masas tumorales que se encuentren localizadas. Por otro lado, la terapia farmacológica se utiliza para reducir la carga tumoral y para prevenir, controlar o tratar el cáncer metastásico. La terapia farmacológica consiste en quimioterapia, la cual principalmente se basa en el uso de compuestos citotóxicos para matar a las células tumorales; así como en la terapia hormonal, misma que utiliza hormonas o fármacos similares a estas que pueden suprimir la proliferación de las células cancerosas. Además, en años recientes también se han desarrollado nuevas aproximaciones terapéuticas para el cáncer de mama, mismo que ha sido posible gracias a los avances en biología molecular e inmunoterapia. Una de estas aproximaciones se refiere a la terapia dirigida, siendo la más conocida el trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Lee et al., 2017; Wu et al., 2017). Al respecto, la Tabla 1 resume las opciones estándar de terapia farmacológica disponibles para el cáncer de mama, con base en sus subtipos moleculares.

Tabla 1. Terapia farmacológica actual para el cáncer de mama, basada en sus subtipos moleculares

(adaptada de Wu et al., 2017).

Subtipo molecular	Otras condiciones	¿Terapia hormonal?	¿Quimioterapia?	¿Terapia anti-HER2 (trastuzumab)?
Luminal A	Baja carga tumoral	Sí	No	No
	Alta carga tumoral o grado 3	Sí	Sí	No
Luminal B	HER2 +	Sí	Sí	Sí
	HER2 -	Sí	Sí	No
HER2 +	No aplica	No	Sí	Sí
Triple negativo	No aplica	No	Sí	No

HER2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, por sus siglas en inglés.

Como se puede observar en la tabla anterior, el cáncer de mama triple negativo no es sensible a la terapia hormonal ni a la terapia dirigida a HER2 como el trastuzumab. Esto conlleva a que la quimioterapia sea la única opción útil de terapia farmacológica; sin embargo, se ha detectado que el 60% de los casos de cáncer de mama triple negativo ya han generado quimiorresistencia. Aunado a esto, este tipo de cáncer es considerado como la forma más agresiva de cáncer de mama, ya que una vez que se diagnostica, generalmente ya se encuentra en una etapa avanzada y tiene una alta mortalidad; por lo tanto, es evidente que este tipo de cáncer es particularmente difícil de tratar (Wu et al., 2017).

Además de lo antes mencionado, la terapia farmacológica posee algunas limitantes que interfieren con su efectividad en el tratamiento del cáncer de mama. Estas abarcan lo siguiente: especificidad insuficiente por células cancerosas, lo cual implica mayor toxicidad para las células sanas; acceso ineficiente a sitios metastásicos como cerebro y hueso, parámetros farmacocinéticos indeseables como rápido aclaramiento y corta vida media, resistencia farmacológica tanto a nivel celular como a nivel del microambiente celular (transporte de eflujo de fármacos, pH, hipoxia, entre otros), dificultad en erradicar células madre tumorales, así como propiedades farmacéuticas indeseables como baja solubilidad en agua y baja estabilidad *in vivo* (Lee et al., 2017; Wu et al., 2017).

En este sentido, la nanomedicina podría posicionarse como una alternativa terapéutica viable para el cáncer de mama, puesto que tiene el potencial para superar algunas de las

limitaciones mencionadas. El uso de nanomateriales en cáncer de mama permite que la terapia sea dirigida a las células tumorales, podrían causar menos efectos adversos, pueden tener una mejor biodisponibilidad, poseen un acceso más eficiente a los sitios tumorales y a los sitios metastásicos debido a su mayor endocitosis y transcitosis, pueden liberar el fármaco de manera controlada y prolongada, además de que algunas nanoformulaciones podrían evitar los mecanismos de resistencia a los fármacos habituales (Lee et al., 2017; Wu et al., 2017).

Dentro de los nanomateriales con potencial terapéutico en cáncer de mama, destacan las nanopartículas magnéticas, mismas que actualmente se están desarrollando principalmente en cuatro áreas: imagenología molecular usando agentes de contraste dirigidos para resonancia magnética, técnicas novedosas para la biopsia de nódulos linfáticos centinela, terapia de hipertermia magnética, así como sistemas de liberación controlada de moléculas terapéuticas como fármacos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otras (Ahmed & Douek, 2013; Wu et al., 2017; Bayda et al., 2020).

Las nanopartículas magnéticas hacen referencia a estructuras conformadas por diferentes elementos metálicos como el hierro, cobalto, níquel, entre otros; donde el hierro es usado en biomedicina como nanopartículas de hierro, óxido de hierro o SPIONs bimetálicos (nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas). Existen tres principales nanopartículas de óxido de hierro: la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la magnetita (Fe_3O_4 ó $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) (Wallyn et al., 2019).

Diversos estudios se han realizado acerca de la liberación de fármacos quimioterapéuticos *in vitro*, mismos que se han enfocado en generar conjugados de nanopartículas magnéticas que permitan la terapia dirigida de los efectos antiproliferativos sobre las células cancerosas. Un ejemplo de esto, es la investigación llevada a cabo por Jain et al. (2005), quienes desarrollaron una formulación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con ácido oleico y ácido plurónico, la cual cargaron con doxorubicina y demostraron su internalización en células MCF-7; observando una retención celular sostenida y una actividad antiproliferativa dependiente de la dosis. Hayashi et al. (2010) desarrollaron nanopartículas de óxido de hierro con folato conjugado como un ligando dirigido para las células de cáncer de mama, siendo esto solubilizado por complejación con ciclodextrina. Esto último resultó en un efecto hipertérmico y en la liberación de tamoxifeno

en las células tumorales. Kikumori et al. (2009) aplicaron un campo magnético a nanopartículas de magnetita en un modelo de ratón, observando regresión tumoral sostenida por 10 semanas, en comparación con el grupo control. Mientras que Ito et al. (2004) conjugaron nanopartículas de magnetita con inmunoliposomas anti-HER2, mismas a las que aplicaron hipertermia en un cultivo de SKBr3 de cáncer de mama; obteniendo significativos efectos antiproliferativos y citotóxicos.

Por otra parte, existe un producto natural conocido como curcumina ((1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-meoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona), el cual ha sido reconocido por sus propiedades antiangiogénicas, antiproliferativas, antitumorígenicas, antioxidantes y antiinflamatorias; tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. La curcumina es un polifenol hidrofóbico derivado de la raíz de la planta Cúrcuma (*Curcuma longa*) (Figura 3), el cual regula negativamente múltiples vías de señalización intracelulares implicadas en el cáncer, incluyendo: factores de crecimiento como EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), proteincinasas como ERKs y JAK (Cinasas reguladas por señales extracelulares y Cinasas de Janus, respectivamente), factores de transcripción como STAT3, NF-κB y AP-1, citocinas como el TNF (factor de necrosis tumoral), receptores celulares como el de estrógenos y HER2; la apoptosis, el ciclo celular y otras proteínas oncogénicas (Shindikar et al., 2016; Wang et al., 2016).

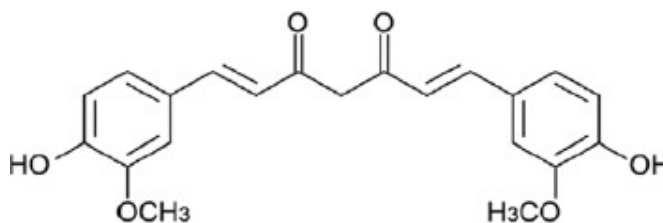


Figura 3. Estructura química de la curcumina (tomada de Wang et al., 2016).

El potencial antitumoral de la curcumina también se ha estudiado en el cáncer de mama. Liu et al. reportaron que esta fue capaz de inhibir la expresión de NF-κB, la cual es una molécula de señalización de supervivencia crucial para la proliferación celular en cáncer de mama. Asimismo, observaron que la curcumina alternaba diferentes vías de señalización río abajo, lo cual logró silenciar a citocinas inflamatorias como CXCL1 y CXCL2. Yim-im et al. encontraron que una combinación de curcumina y sus análogos AS-KTC006 y AS-KTC021

podría inhibir una tirosín-cinasa en específico y, con ello, actuar en contra de HER2. Además, otras investigaciones han señalado que la curcumina también suprime el crecimiento del cáncer de mama al afectar factores implicados en la metástasis, así como al interferir en los mecanismos del estrés oxidativo relacionados con la carcinogénesis (Wang et al., 2016). Algunos de los blancos moleculares de la curcumina se muestran en la Figura 4.

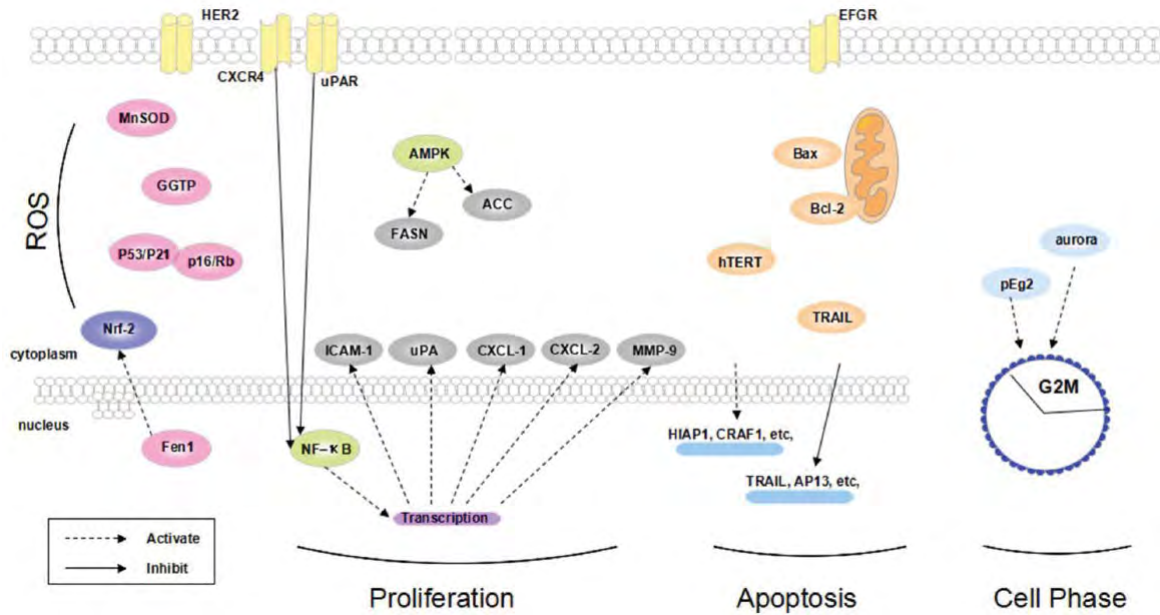


Figura 4. Blancos moleculares de la curcumina implicados en el estrés oxidativo (ROS por sus siglas en inglés), proliferación, apoptosis y arresto del ciclo celular (tomada de Wang et al., 2016).

Finalmente, cabe mencionar que la curcumina posee la propiedad de unirse a determinados iones metálicos divalentes como el hierro, cobre, manganeso y zinc; formando complejos con gran potencial terapéutico (González, 2015). Además, la superficie de las nanopartículas magnéticas como la magnetita, puede ser modificada para mejorar su estabilidad, biocompatibilidad, especificidad y efecto terapéutico; para lo cual, se podrían agregar moléculas bioactivas como la curcumina (Lee et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama representa un problema de salud pública a nivel mundial puesto que es la primera causa de defunciones por cáncer en mujeres, tanto en países desarrollados como en los países en desarrollo. En los últimos años, la tasa de mortalidad por cáncer de mama ha incrementado sustancialmente y México no es la excepción. Tan solo en el 2018, el cáncer de mama tuvo una incidencia del 14.3% y una tasa de mortalidad del 8.2% (WHO, 2020). Mientras que en México actualmente es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Esto se debe principalmente al retraso en el inicio del tratamiento, mismo que está relacionado con la demora en el diagnóstico definitivo (INSP, 2020). Actualmente, los tratamientos disponibles para esta compleja patología siguen siendo altamente invasivos, carentes de especificidad por las células tumorales, con un acceso ineficiente a sitios metastásicos y un elevado riesgo de causar efectos adversos. Además, las células cancerosas pueden generar resistencia a la quimioterapia, tal como ya se ha reportado para el 60% de los casos de cáncer de mama triple negativo (Wu et al., 2017).

Debido a lo anterior, resulta imprescindible desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que permitan un óptimo tratamiento del cáncer de mama. En este sentido, el uso de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina representa una terapia potencial, puesto que su implementación individual en el tratamiento del cáncer de mama ya se ha reportado previamente; por lo que, su uso conjunto podría derivar en un mejor efecto citotóxico en cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina podrían ejercer un efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad citotóxica de las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina, en dos líneas celulares de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Funcionalizar nanopartículas de magnetita con curcumina.
2. Caracterizar las nanopartículas de magnetita con curcumina.
3. Evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas de magnetita modificadas con curcumina, en cultivos celulares de dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231 y MCF-7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama, las cuales fueron: MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) y MCF-7 (ATCC® HTB-22™), así como MS-5 como control de células sanas. La primera corresponde al cáncer de mama triple negativo y son células derivadas de adenocarcinoma, mismas que expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α , por sus siglas en inglés), así como el oncogén WNT7B (ATCC, 2014). La segunda línea celular es MCF-7, misma que consiste en células derivadas de carcinoma ductal invasivo y que expresan los receptores de estrógeno y progesterona, así como el oncogén WNT7B y a BP-2, BP-4 y BP-5; las cuales son proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP, por sus siglas en inglés) (ATCC, 2011). Mientras que MS-5 corresponde a células del estroma provenientes de ratón (*Mus musculus*), las cuales fueron establecidas por irradiación de células adherentes en cultivos de médula ósea de larga duración, derivados de la cepa de ratón C3H/HeNSIc (DSMZ, 2015). Los medios de cultivo y suplementos utilizados para cada línea celular se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de medios de cultivo para cada línea celular utilizada.

Línea celular	Medio de cultivo y suplementos
MDA-MB-231	Medio F12K + 10% de suero fetal bovino + penicilina-estreptomicina* + buffer HEPES.
MCF-7	Medio MEM + 0.1% de insulina + 10% de suero fetal bovino + penicilina-estreptomicina* + buffer HEPES.
MS-5	Medio α -MEM + 10% de suero fetal bovino + penicilina-estreptomicina* + buffer HEPES.

*50-100 UI/ml de penicilina y 50-100 μ g/ml de estreptomicina.

Otros materiales

Curcumina (C₂₁H₂₀O₆/Sigma-Aldrich®), magnetita (Fe₃O₄/Nanomagnetita de Carbomex®/NP-026-01-P-050G), etanol absoluto, reactivo MTT, solución solubilizante de

10% (p/p) de SDS + 0.01 N HCl, dimetilsulfóxido (DMSO por sus siglas en inglés), tripsina-EDTA, buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés), NaCl al 0.9%.

Funcionalización superficial con curcumina

En primer lugar, las nanopartículas de magnetita (Nanomagnetita de Carbomex®/NP-026-01-P-050G), fueron lavadas con agua destilada, sometidas a sonicación y resuspendidas en etanol absoluto (para limpiarlas). Las muestras de curcumina inmovilizada en la superficie de las nanopartículas magnéticas, fueron suministradas por la M. en C. Jessica Flood, estudiante del Doctorado en Biomedicina Molecular de la UDLAP. Para la preparación de dichas nanopartículas, se siguió el procedimiento descrito por Minutti (2018).

Caracterización

- **FTIR:** Se usó un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Agilent Cary 630®, en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , para las muestras de magnetita y el sistema magnetita-curcumina.
- **TGA/DTA:** El Análisis Termogravimétrico (TGA) y el Análisis Térmico Diferencial (DTA) fueron realizados por Jessica Flood, empleando el equipo Netzsch STA 2500 Regulus, corriendo una muestra de 10 mg de curcumina y una muestra de 10 mg del sistema magnetita-curcumina en el intervalo de 20 a 800 °C en una atmósfera de nitrógeno y a una velocidad de 5 °C/min.
- **DLS:** El tamaño y la distribución de las partículas del sistema magnetita-curcumina fueron determinados mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés), usando el equipo NANO-flex 180° de Microtrac®.
- **SEM:** El Dr. Miguel Ángel Méndez obtuvo las micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de las muestras de magnetita y el sistema magnetita-curcumina, utilizando un microscopio electrónico de barrido de ultra alta resolución (MAIA3 de TESCAN®).

Ensayos de MTT

Esta prueba se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa hacia

formazán (un compuesto de color azul o morado) (Figura 5); permitiendo esto determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo que esta reacción de reducción solo ocurrirá en células vivas que son metabólicamente activas, midiendo así la viabilidad celular. Este método puede ser empleado para determinar el efecto citotóxico de un compuesto en particular sobre cultivos celulares, en este caso, las nanopartículas de magnetita conjugadas con curcumina en células de cáncer de mama; en donde la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado, puesto que esto es indicativo de su actividad metabólica (Acosta et al., 2019). Después de colocar el MTT, las células son tratadas con un solvente orgánico para liberar y solubilizar el formazán; para posteriormente, medir la absorbancia de este compuesto azulado/morado por espectrofotometría UV a 570 nm.

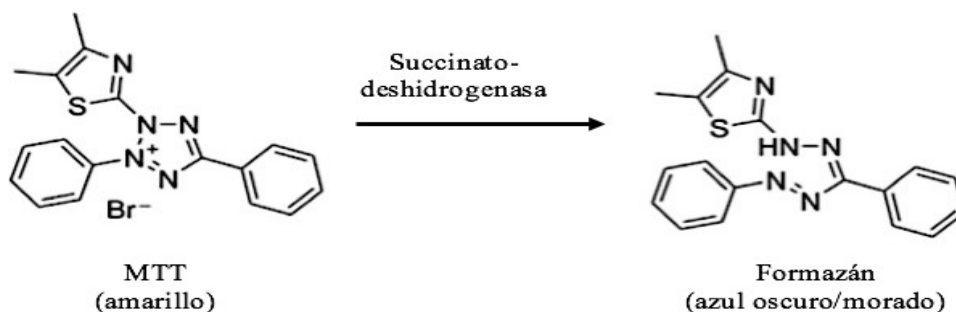


Figura 5. Fundamento del ensayo de MTT (adaptada de Kuete et al., 2017). El MTT es reducido a formazán, un compuesto colorimétrico, mediante la enzima succinato-deshidrogenasa.

Magnetita


Una solución stock conteniendo 1 mg/ml de magnetita disuelta en solución salina, fue proporcionada por la M. en C. Jessica Flood, de la cual se tomaron 250 μl y se le agregaron 750 μl de solución salina para formar una solución de 0.25 mg/ml de magnetita; de esta solución se tomaron diferentes volúmenes con el fin de alcanzar 16 concentraciones distintas de magnetita en los pozos: 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.5, 8.0, 10, 12.5, 15 y 18 ppm. A cada pozo se le agregó el volumen necesario de PBS para completar 100 μl por pozo; tal como se muestra en la Tabla 2.


Por otro lado, de la solución stock de 1 mg/ml de magnetita se preparó una solución de 0.01 mg/ml al tomar 10 μl del stock y agregar 990 μl de solución salina. Esta solución se utilizó para conseguir las siguientes concentraciones de magnetita en los pozos: 0.025, 0.05,

0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 0.9 ppm; agregándose el volumen correspondiente de PBS para completar 100 µl por pozo (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de soluciones de Fe₃O₄ y Fe₃O₄-curcumina para ensayos de MTT con 24 concentraciones diferentes.

Número	Concentración en pozo (ppm)	Concentración de solución (mg/ml)	Volumen de solución agregado (µl)	Volumen de PBS (µl)
1	18	0.18	72	28
2	15	0.15	60	40
3	12.5	0.125	50	50
4	10	0.1	40	60
5	8	0.08	32	68
6	7.5	0.075	30	70
7	5	0.05	20	80
8	4	0.04	16	84
9	3.5	0.035	14	86
10	3	0.03	12	88
11	2.5	0.025	10	90
12	2	0.02	8	92
13	1.75	0.0175	7	93
14	1.5	0.015	6	94
15	1.25	0.0125	5	95
16	1	0.01	4	96
17	0.9	0.009	90	10
18	0.75	0.0075	75	25
19	0.5	0.005	50	50
20	0.25	0.0025	25	75
21	0.1	0.001	10	90
22	0.075	0.00075	7.5	92.5
23	0.05	0.0005	5	95
24	0.025	0.00025	2.5	97.5

 De la solución de 0.25 mg/ml de Fe₃O₄ o de Fe₃O₄-curcumina.

 De la solución de 0.01 mg/ml de Fe₃O₄ o de Fe₃O₄-curcumina.

Sistema magnetita-curcumina

Una solución de 1 mg/ml del sistema magnetita-curcumina fue proporcionada por la M. en C. Jessica Flood, a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las 24 concentraciones diferentes, tal como se hizo para las nanopartículas de magnetita; agregándose los mismos volúmenes de solución y PBS para completar 100 μ l por pozo (Tabla 3).


Curcumina


Una solución stock de 10 mg/ml de curcumina disuelta en DMSO fue proporcionada por la M. en C. Jessica Flood, de la cual se tomaron 25 μ l y se le agregaron 975 μ l del medio de cultivo correspondiente (F12K para MDA-MB-231, MEM para MCF-7 y α -MEM para MS-5), para formar una solución de 0.25 mg/ml. De esta última se tomaron diferentes volúmenes para alcanzar 16 concentraciones distintas de curcumina en los pozos: 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.5, 8.0, 10, 12.5, 15 y 18 ppm. A cada pozo se le agregó el volumen necesario del medio de cultivo asignado a cada línea celular para completar 100 μ l; tal como se muestra en la Tabla 4.

Por otra parte, de la solución stock de 10 mg/ml de curcumina se preparó una solución de 1 mg/ml al tomar 100 μ l del stock y agregar 900 μ l del medio de cultivo respectivo. De esta solución se tomaron 5 μ l y se añadieron 995 μ l del medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, obteniendo una solución de 0.01 mg/ml de curcumina; de la cual, se tomaron diferentes volúmenes y se completaron los 100 μ l por pozo con medio de cultivo, de tal manera que se tuvieran las siguientes concentraciones: 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 0.9 ppm (Tabla 4).

Tabla 4. Preparación de soluciones de curcumina para ensayos de MTT con 24 concentraciones diferentes.

Número	Concentración en pozo (ppm)	Concentración de solución (mg/ml)	Volumen de solución agregado (µl)	Volumen de medio (µl)
1	18	0.18	72	28
2	15	0.15	60	40
3	12.5	0.125	50	50
4	10	0.1	40	60
5	8	0.08	32	68
6	7.5	0.075	30	70
7	5	0.05	20	80
8	4	0.04	16	84
9	3.5	0.035	14	86
10	3	0.03	12	88
11	2.5	0.025	10	90
12	2	0.02	8	92
13	1.75	0.0175	7	93
14	1.5	0.015	6	94
15	1.25	0.0125	5	95
16	1	0.01	4	96
17	0.9	0.009	90	10
18	0.75	0.0075	75	25
19	0.5	0.005	50	50
20	0.25	0.0025	25	75
21	0.1	0.001	10	90
22	0.075	0.00075	7.5	92.5
23	0.05	0.0005	5	95
24	0.025	0.00025	2.5	97.5

 De la solución de 0.25 mg/ml de curcumina.

 De la solución de 0.01 mg/ml de curcumina.

MTT de MDA-MB-231

Se sembraron 5 placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^4 células MDA-MB-231 por pozo, agregándose el volumen necesario de medio F12K suplementado para completar 100 μ l en cada pozo; en una atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron los distintos tratamientos a probar, en 24 concentraciones diferentes. A una placa se le añadieron las nanopartículas de magnetita y a dos placas el sistema magnetita-curcumina, tal como se refirió en la Tabla 3. Mientras que a dos placas se les agregó curcumina (Tabla 4), aunque cabe mencionar que en la segunda placa únicamente se probaron 21 de las 24 concentraciones descritas en la Tabla 4. Las 5 placas fueron incubadas a las mismas condiciones estándar por 24 h, después de lo cual, se retiraron los tratamientos, se lavó con PBS y se agregaron 10 μ l de solución MTT y 90 μ l de medio F12K suplementado a cada pozo. Las placas fueron incubadas a condiciones estándar por 3 h, se les añadieron 100 μ l de solución solubilizante a cada pozo y finalmente, se midió su absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro UV.

MTT de MCF-7

Se sembraron 4 placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^4 células MCF-7 por pozo, agregándose el volumen necesario de medio MEM suplementado para completar 100 μ l en cada pozo; en una atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C durante 24 h. El medio de cultivo fue retirado y se agregaron los diferentes tratamientos a probar, en 24 concentraciones distintas. A dos placas se les agregó el sistema magnetita-curcumina y a las otras dos, curcumina; de acuerdo con los volúmenes indicados en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Las placas fueron incubadas a las mismas condiciones estándar por 24 h, después de lo cual, se retiraron los tratamientos, se lavó con PBS y se agregaron 10 μ l de solución MTT y 90 μ l de MEM suplementado a cada pozo. Las placas fueron incubadas a condiciones estándar por 3 h, se les añadieron 100 μ l de solución solubilizante a cada pozo y se midió su absorbancia a 570 nm.

MTT de MS-5

Se sembraron 4 placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^4 células MS-5 por pozo, añadiéndose el volumen necesario de medio α -MEM suplementado para completar 100 μ l en

cada pozo; en una atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C durante 24 h. El medio de cultivo fue retirado y se agregaron los diferentes tratamientos a probar, en 24 concentraciones distintas. A una placa se le añadieron las nanopartículas de magnetita y a dos placas el sistema magnetita-curcumina, de acuerdo con lo estipulado en la Tabla 3; mientras que a una placa se le agregó la curcumina de acuerdo con lo señalado en la Tabla 4 (a excepción de la concentración de 0.075 ppm). Las placas fueron incubadas a las mismas condiciones estándar por 24 h, después de lo cual, se retiraron los tratamientos, se lavó con PBS y se agregaron 10 µl de solución MTT y 90 µl de medio α -MEM suplementado a cada pozo. Las placas fueron incubadas a condiciones estándar por 3 h, se les añadieron 100 µl de solución solubilizante a cada pozo y se midió su absorbancia a 570 nm.

RESULTADOS

Caracterización de nanopartículas

FTIR

En primer lugar, se obtuvieron los espectros de infrarrojo para las muestras de magnetita y el sistema magnetita-curcumina, los cuales se comparan en la Figura 6 con un espectro de infrarrojo de curcumina sola (proporcionado por el Dr. Miguel Ángel Méndez). Para la magnetita, se observa su pico característico de la vibración Fe-O a 570 cm^{-1} . Para la curcumina sola se aprecian las siguientes bandas: a 3500 cm^{-1} correspondiente al grupo O-H de los fenoles, a 1600 cm^{-1} por la vibración de estiramiento de los anillos bencénicos, a 1500 cm^{-1} por las vibraciones C=C y C=O, a 1260 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento de C-O aromático y a 800 y 850 cm^{-1} asociadas a los bencenos trisustituidos (Devkota et al., 2013). Mientras que para el sistema magnetita-curcumina se conservan tanto la banda característica de la magnetita antes mencionada, como las bandas propias de la estructura de la curcumina, a excepción de la banda del grupo O-H de los fenoles a 3500 cm^{-1} ; aunque cabe destacar que estas bandas (a 800 , 850 , 1260 , 1500 y 1600 cm^{-1}) son mucho menos acentuadas en comparación con el espectro de la curcumina sola. Esto denota que las nanopartículas de magnetita están funcionalizadas con la curcumina.

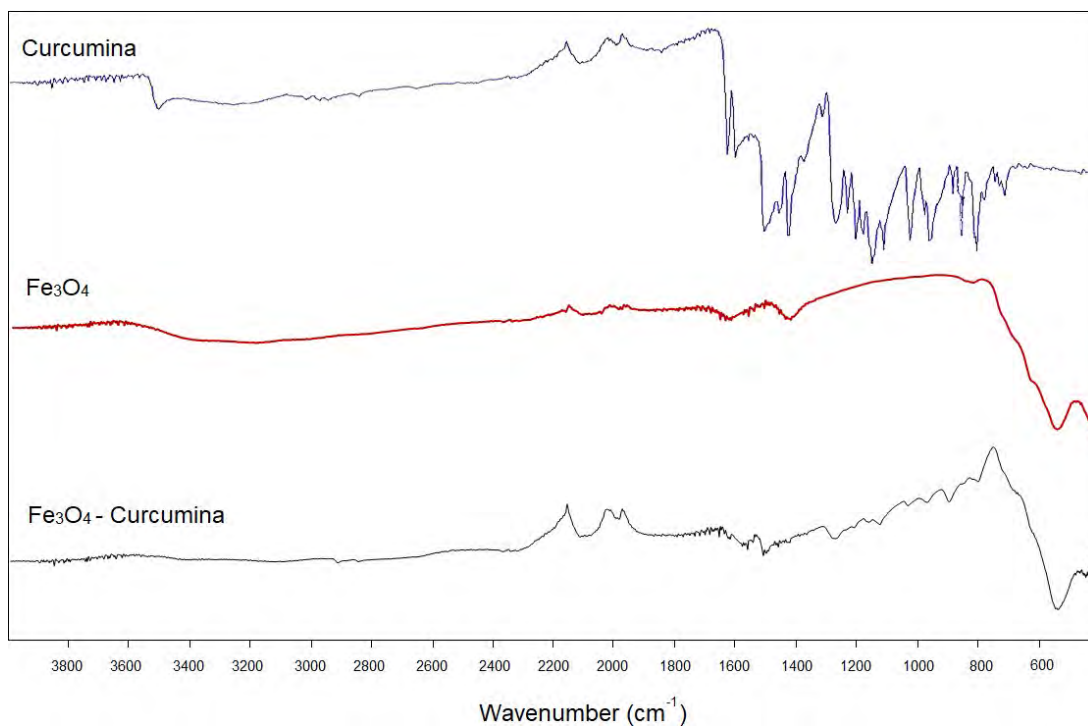


Figura 6. Espectro Infrarrojo comparativo de la curcumina, las nanopartículas de magnetita y las nanopartículas de magnetita con curcumina.

DLS

Mediante DLS se determinó el tamaño y la distribución de las partículas en el sistema magnetita-curcumina (Figura 7), teniendo que se observó una distribución bimodal, con 72.3% de las nanopartículas presentando un diámetro hidrodinámico de 76.6 nm; observándose agregados (dímeros) de 192.7 nm (27.7%). En las condiciones de medición, la mayoría de las nanopartículas se encontraban dispersas, y de tamaño homogéneo.

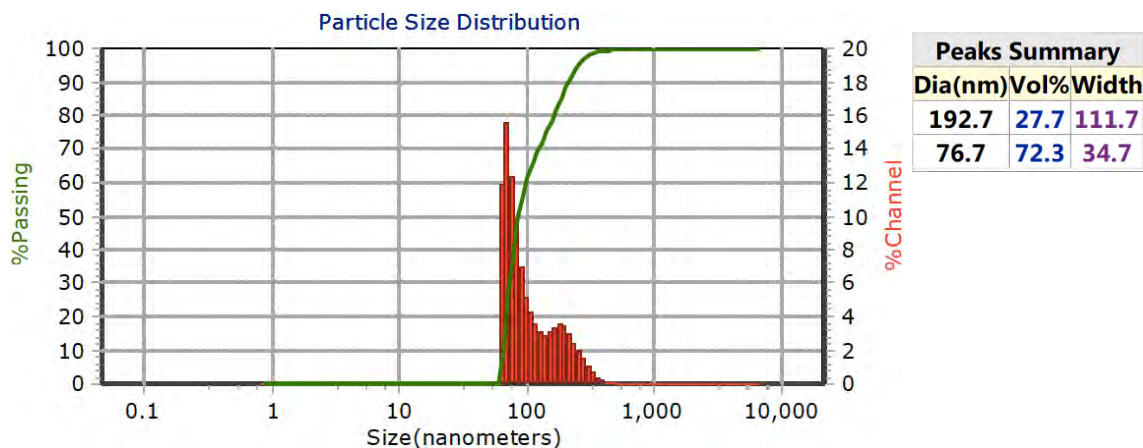


Figura 7. DLS del sistema magnetita-curcumina. Se observa que el diámetro de las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina oscila entre los 76.7 y 192.7 nm, predominando aquellas de 76.7 nm.

TGA

Se realizó el TGA y el DTA de la muestra de curcumina (Figura 8), así como el TGA/DTA de la magnetita pura (Figura 9) y del sistema magnetita-curcumina (Figura 10) en un intervalo de temperatura de 20 a 800 °C. La Figura 8 muestra tres caídas asociadas a la pérdida de masa de la curcumina, siendo la primera de ellas a 170 °C, mientras que un pico aproximadamente a los 150 °C hace referencia a un proceso exotérmico y está correlacionado con la pérdida de masa de curcumina mostrada en la curva termogravimétrica.

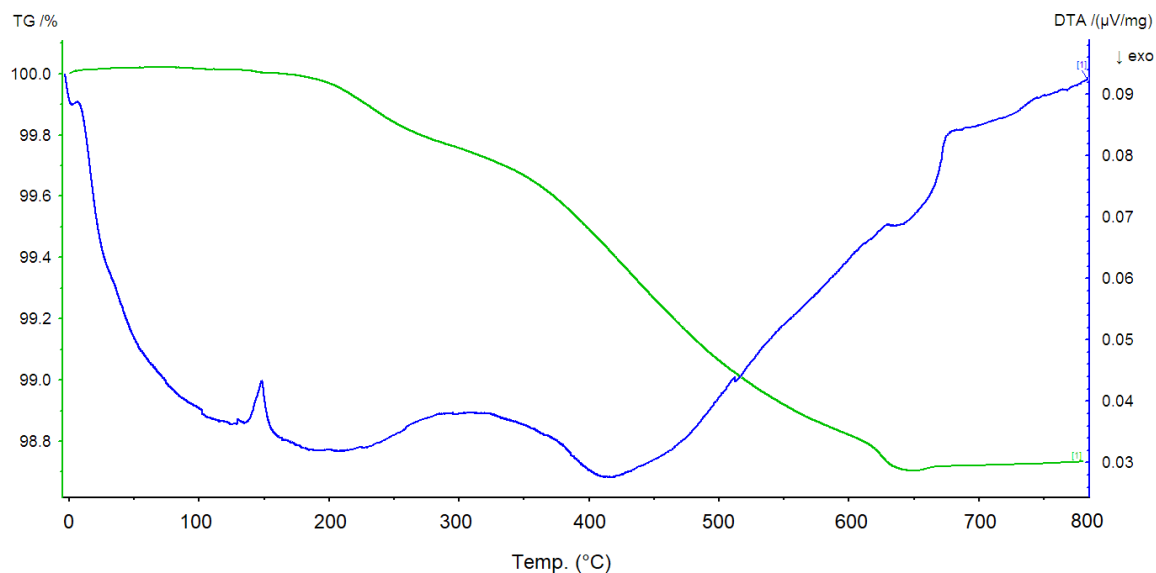


Figura 8. Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de la curcumina.

En la Figura 9 se muestra el TGA/DTA de la magnetita pura. Se puede observar que no hay pérdidas de masa significativas, indicando la estabilidad del material en el rango térmico analizado. En la curva de DTA se nota que entre 100 y 150 °C ocurre un proceso exotérmico asociado con deshidratación, mientras que hacia 550-600 °C se presenta un proceso que puede estar relacionado con la recristalización de la magnetita.

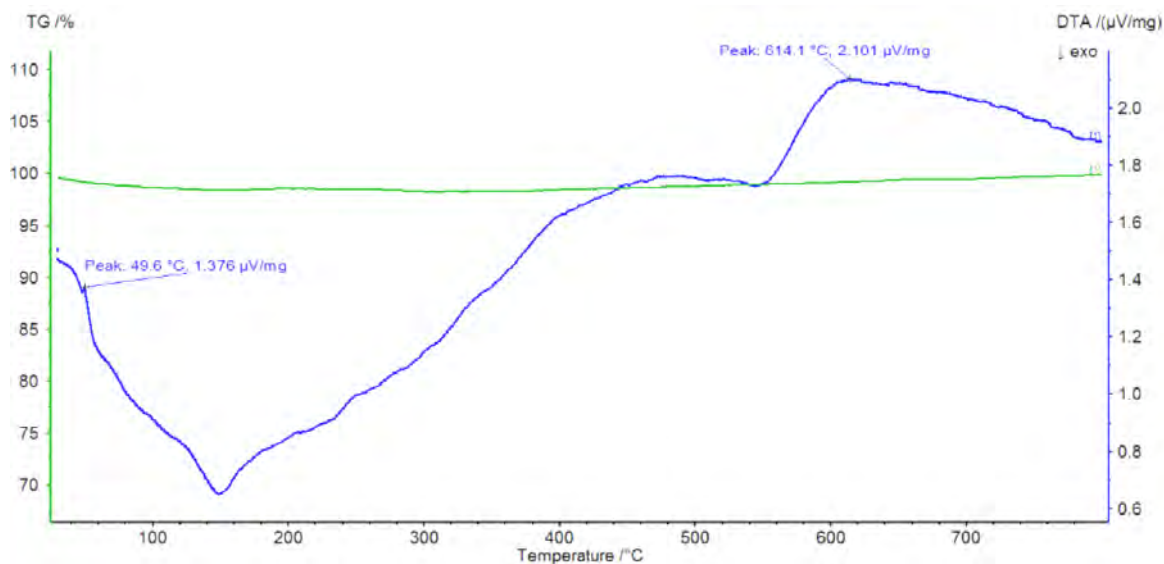


Figura 9. Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) de la magnetita.

Por otro lado, en la Figura 10 se aprecia una única caída que comienza a 208.7°C, la cual indica una pérdida de masa relacionada con la curcumina de aproximadamente 6%.

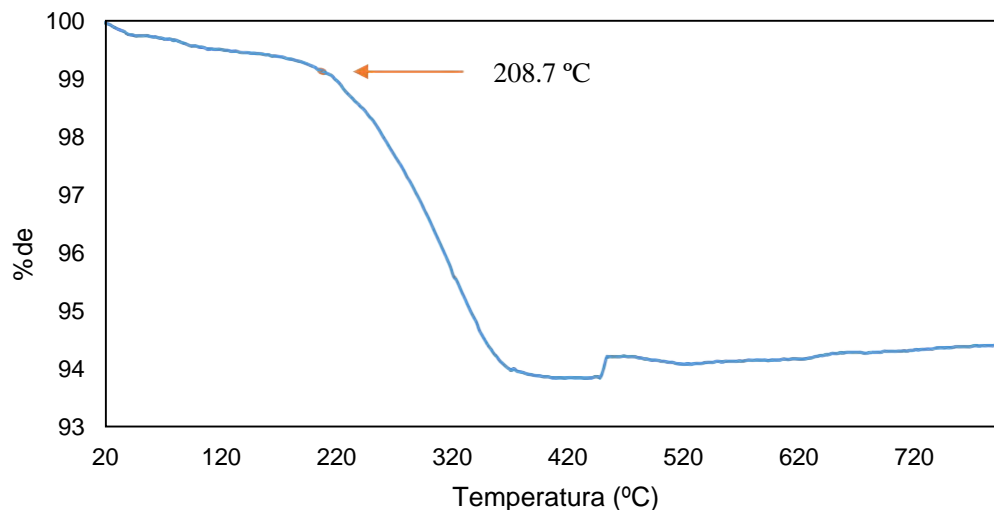


Figura 10. Termogravimetría (TG) del sistema magnetita-curcumina.

SEM

Mediante SEM se obtuvieron micrografías de las nanopartículas de magnetita (Figura 11) y del sistema magnetita-curcumina (Figura 12). En la Figura 11 se aprecian nanopartículas de entre 50 y 100 nm, las cuales son quasiesféricas con una distribución predominantemente homogénea; siendo que solo se observa un agregado de nanopartículas. En la Figura 12, aunque no es totalmente nítida, se observan las nanopartículas de magnetita conjugadas con curcumina, mismas que presentan una forma quasiesférica y un tamaño de entre 20 y 30 nm; la menor distribución de tamaño de partícula se relaciona al hecho de que las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina se agregan menos que las nanopartículas de magnetita no funcionalizadas, fungiendo la curcumina como un agente modificador superficial o surfactante.

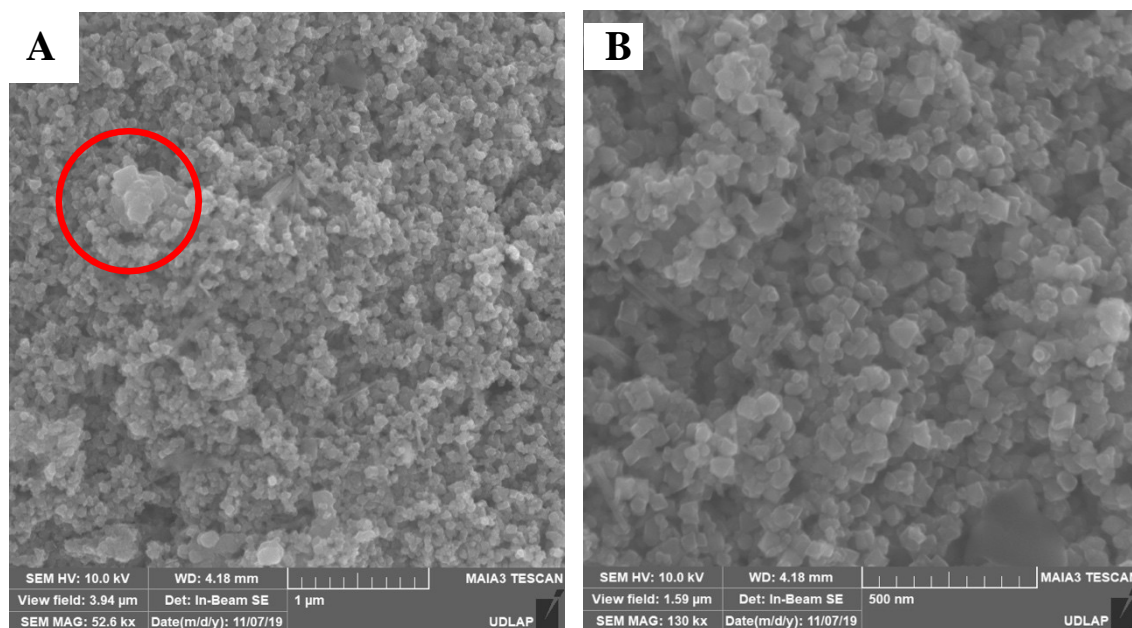


Figura 11. Análisis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por SEM. Se observan nanopartículas de magnetita quasiesféricas y se aprecia que están uniformemente distribuidas, en general no presentan aglomeraciones y tienen un tamaño de entre 50 y 100 nm. A) Nanopartículas observadas a 52.6 kx; únicamente se presenta un agregado de nanopartículas (señalado en rojo). B) Nanopartículas observadas a 130 kx; no se presentan agregados de nanopartículas.

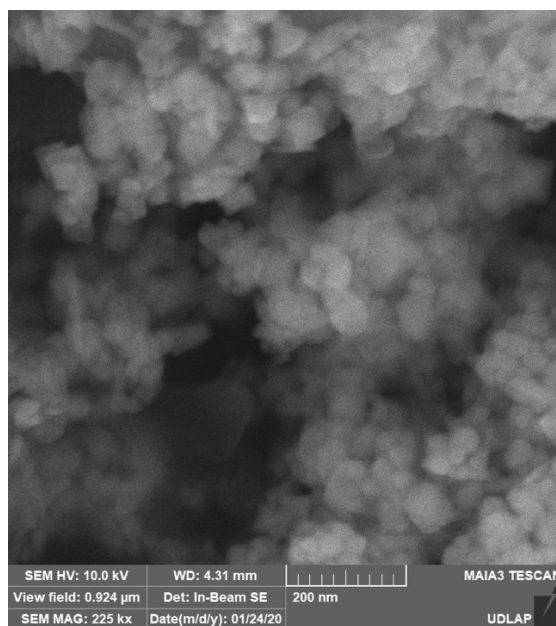


Figura 12. Análisis por SEM del sistema magnetita-curcumina. Se observan las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina a 225 kx, apreciándose su forma quasiesférica y un menor tamaño asociado al depósito de la curcumina.

Ensayos de MTT

A continuación, se presentan los resultados de viabilidad celular a las 24 h obtenidos mediante los ensayos de MTT para las dos líneas celulares de cáncer de mama y el control de células sanas (MS-5) evaluadas en el presente trabajo, las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos: nanopartículas de magnetita, el sistema magnetita-curcumina y curcumina sola.

MDA-MB-231

La Figura 13 muestra la viabilidad celular a las 24 h obtenida para las células MDA-MB-231 después de ser tratadas con nanopartículas de magnetita. En la concentración más baja (0.025 ppm) se observa una viabilidad celular del 72.8%, mientras que en la concentración más alta de magnetita (18 ppm) se aprecia una viabilidad del 78.0%. En general, se observa que los resultados oscilan entre el 68.7 y el 83.8% de viabilidad celular, siendo el promedio de 77.6% y la desviación estándar promedio de ± 3.32 (Tabla 5). No se aprecia una relación directamente proporcional entre la concentración de magnetita y su efecto citotóxico o disminución de la viabilidad celular. Además, el efecto citotóxico es mínimo.

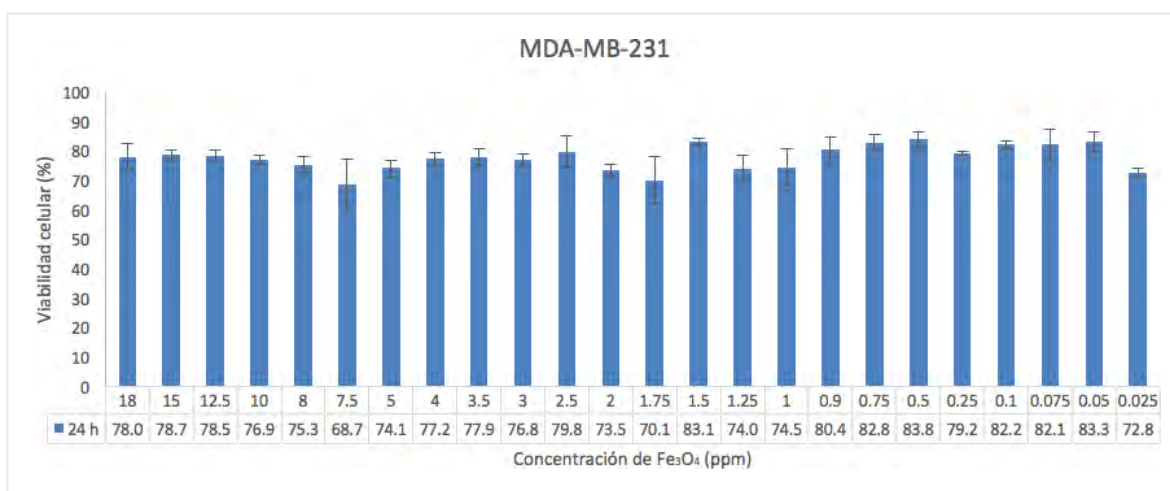


Figura 13. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de magnetita (Fe₃O₄). Para todas las concentraciones de magnetita se observan viabilidades celulares que oscilan entre 68.7 y 83.8%, con un promedio de viabilidad celular de 77.6%.

Las Figuras 14 y 15 muestran los porcentajes de viabilidad celular para MDA-MB-231 posterior a su tratamiento con las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con

curcumina. En la Figura 14 los resultados varían entre 64.5% (correspondiente a la mayor concentración evaluada) y 84.1%, siendo el promedio de viabilidad celular de 74.0%, mientras que en la Figura 15 oscilan entre 78.2% y 98.7% (este último para la concentración de 0.025 ppm), con un promedio de viabilidad celular de 82.7%. Al promediar los resultados de estas dos figuras, se obtiene que la viabilidad celular promedio con el tratamiento del sistema magnetita-curcumina es de 78.4% con una desviación estándar de ± 4.79 ; tal como se muestra en la Tabla 5. Nuevamente, los resultados son variados y no se observa una relación proporcional entre el aumento de la concentración del sistema magnetita-curcumina y la disminución en la viabilidad celular; siendo el efecto citotóxico mínimo.

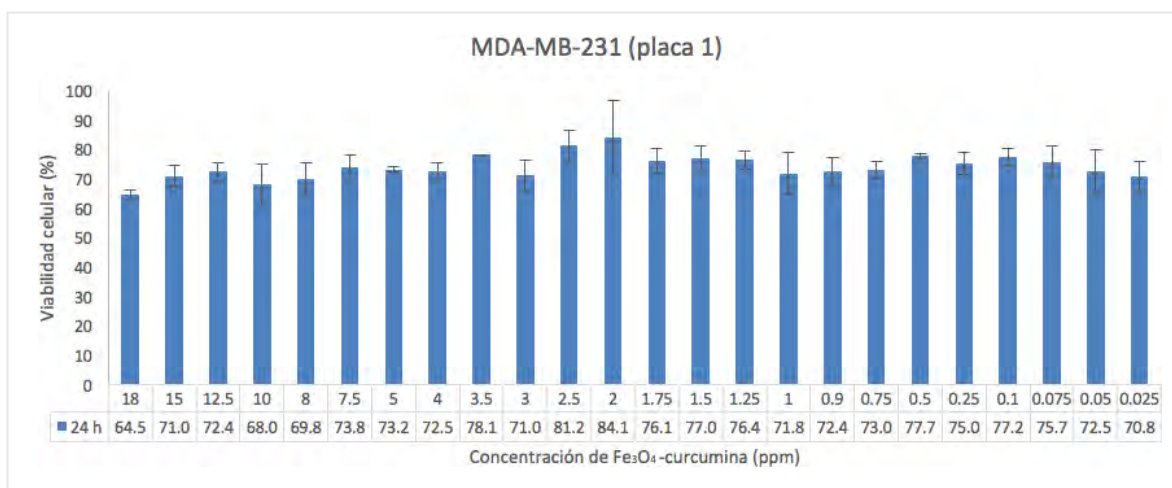


Figura 14. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 64.5 y 84.1%, con un promedio de viabilidad celular de 74.0%.

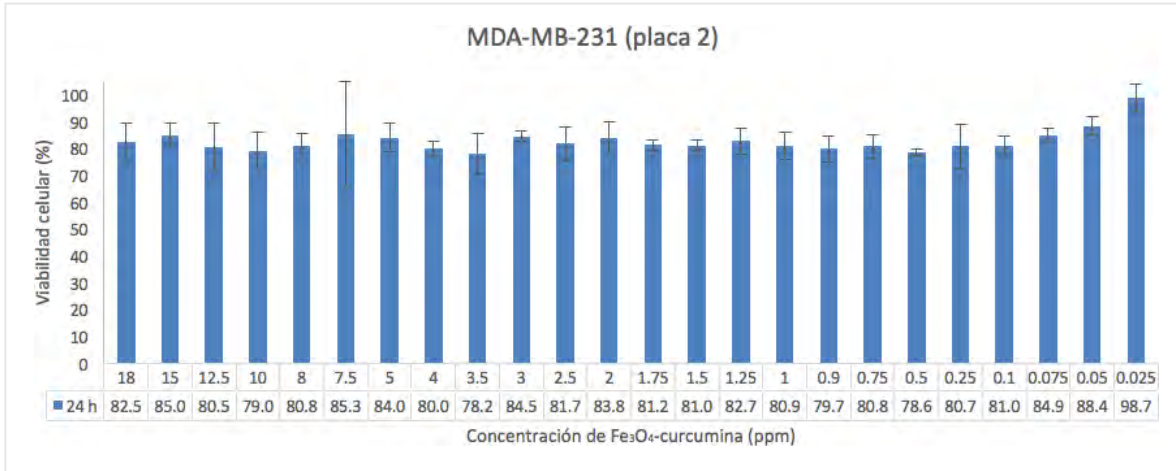


Figura 15. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 78.2 y 98.7%, con un promedio de viabilidad celular de 82.7%.

Las Figuras 16 y 17 presentan la viabilidad celular obtenida para las diferentes concentraciones de curcumina probadas en MDA-MB-231. En la Figura 16 los resultados oscilan entre 77.2% y 94.4% (este último correspondiente a la mayor concentración probada), con un promedio de viabilidad celular de 86.6%, mientras que en la Figura 17 están entre 78.2 y 93.3%, siendo el promedio de 86.1%; es decir, los datos son semejantes y al promediarlos se tiene que la viabilidad celular promedio con curcumina es de 86.4%, siendo la desviación estándar promedio de ± 3.31 (Tabla 5). No se observa una relación proporcional entre la concentración de curcumina y la disminución en la viabilidad celular.

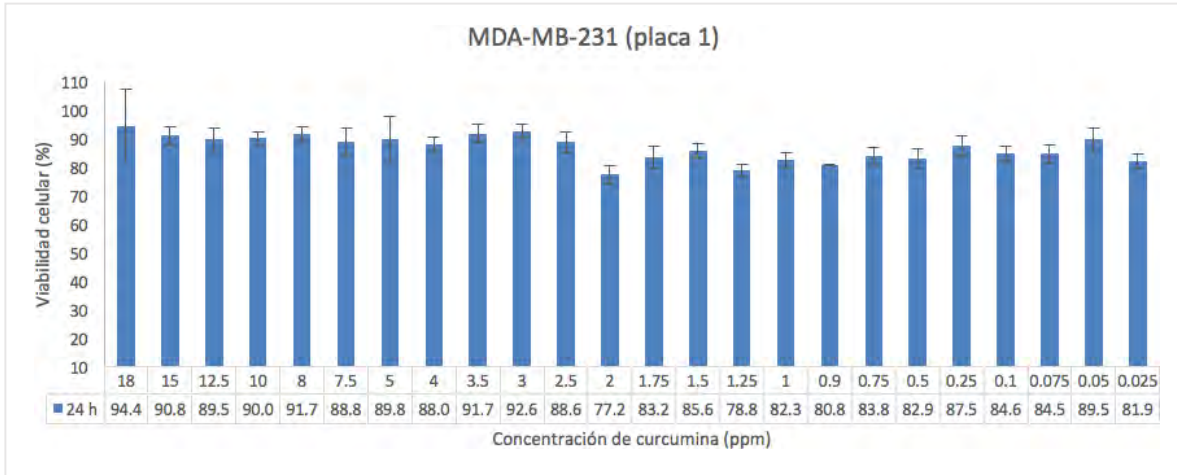


Figura 16. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 77.2 y 94.4%, con un promedio de viabilidad celular de 86.6%.

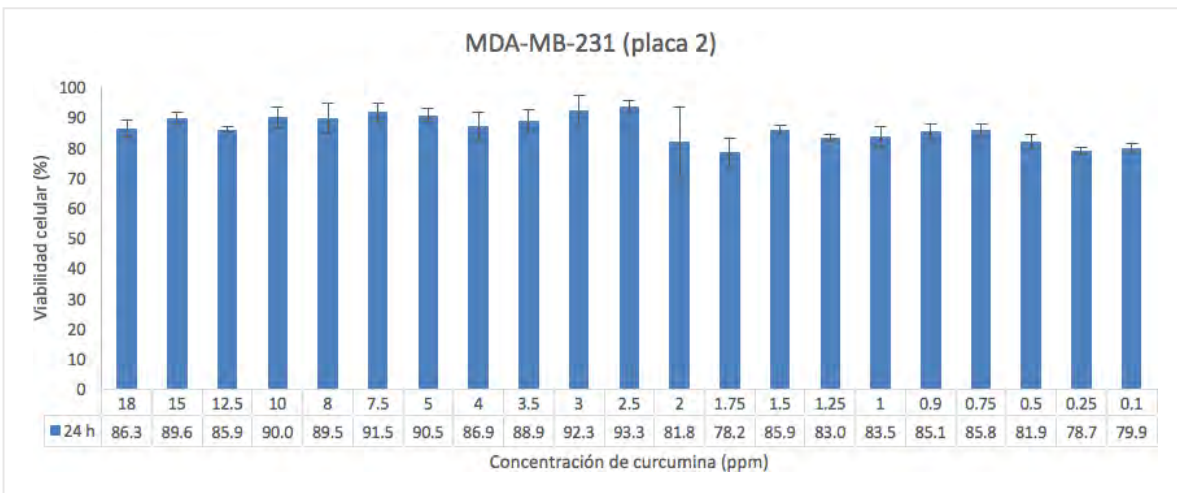


Figura 17. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 de la placa 2, después de ser tratadas con 21 diferentes concentraciones de curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 78.2 y 93.3%, con un promedio de viabilidad celular de 86.1%.

Tabla 5. Resultados de viabilidad celular de MDA-MB-231 a las 24 h, determinados por MTT.

Viabilidad celular de MDA-MB-231 a 24 h						
Tratamiento	Porcentaje mínimo (%)	Desviación estándar	Porcentaje promedio (%)	Desviación estándar promedio	Porcentaje máximo (%)	Desviación estándar
Sistema magnetita-curcumina	71.4	4.51	78.4	4.79	91.4	8.72
Nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄)	68.7	8.72	77.6	3.32	83.8	2.57
Curcumina	77.7	3.86	86.4	3.31	93.9	7.30

MCF-7

Las Figuras 18 y 19 muestran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos para el sistema magnetita-curcumina en cultivos celulares de MCF-7. En la Figura 18 se observan resultados entre 60.7 y 73.2%, mismos que corresponden a la mayor y menor concentración de magnetita-curcumina, respectivamente; teniendo un promedio de viabilidad celular de 68.1%. Mientras que en la Figura 19, los valores de viabilidad celular oscilan entre 56.6 y 74.5%, correspondiendo este último a la menor concentración probada; siendo el promedio de viabilidad celular de 65.7%. Al promediar los resultados de ambas gráficas, se obtiene que la viabilidad celular promedio de las nanopartículas conjugadas con curcumina en MCF-7 es de 66.9%, con una desviación estándar promedio de ± 2.86 (Tabla 6). No se observa una relación lineal para las concentraciones de magnetita-curcumina con respecto a la viabilidad celular.

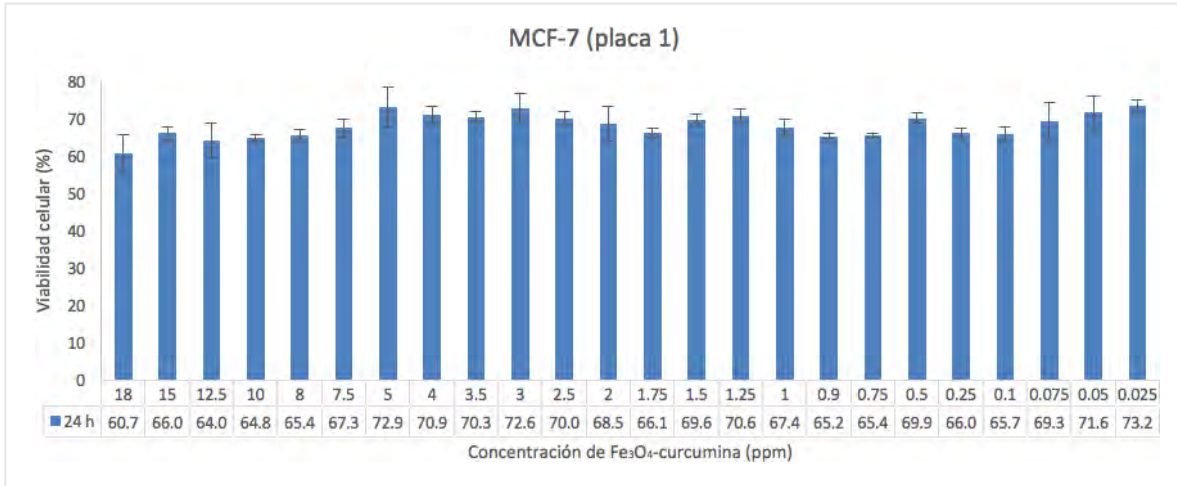


Figura 18. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 60.7 y 73.2%, con un promedio de viabilidad celular de 68.1%.

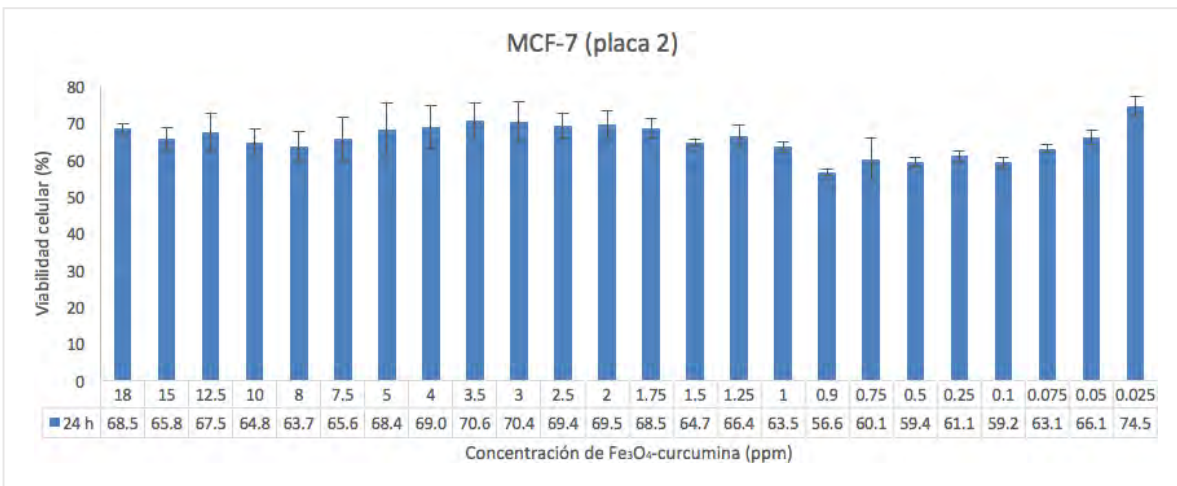


Figura 19. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 56.6 y 74.5%, con un promedio de viabilidad celular de 65.7%.

Las Figuras 20 y 21 presentan los porcentajes de viabilidad celular de MCF-7 con el tratamiento de curcumina. En la Figura 20 estos se encuentran entre 72.4 y 88.3%, correspondiendo este último a la menor concentración, teniendo un promedio de viabilidad celular de 78.2%; mientras que en la Figura 21 los valores de viabilidad están entre 65.6 y 81.0%, siendo el promedio de 72.5%. Al promediar los resultados de ambas figuras, se obtiene una viabilidad celular promedio de 75.4% con una desviación estándar promedio de

± 4.31 (Tabla 6). Estos resultados no presentan una relación proporcional entre las concentraciones de curcumina y su efecto citotóxico, siendo este último mínimo.

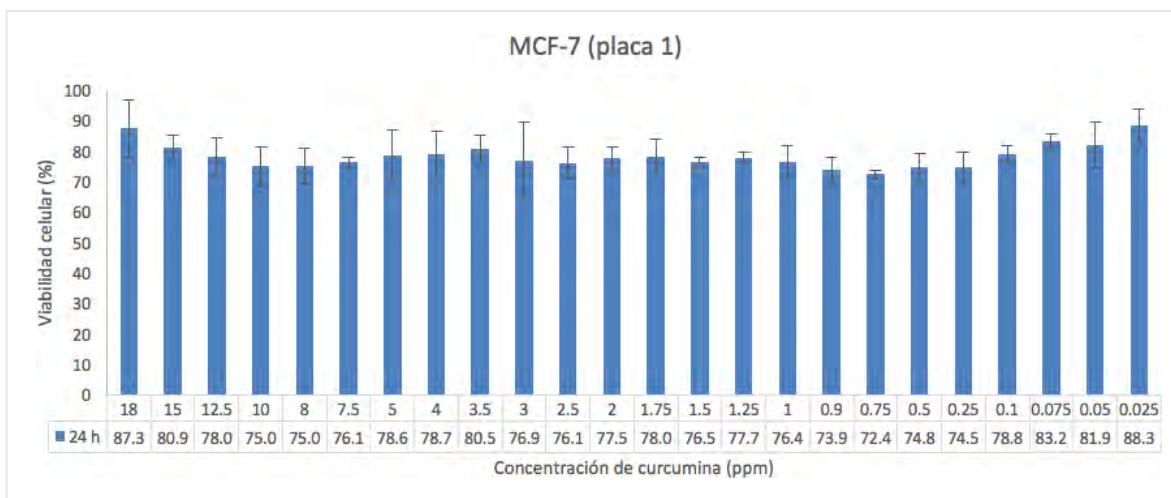


Figura 20. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 72.4 y 88.3%, con un promedio de viabilidad celular de 78.2%.

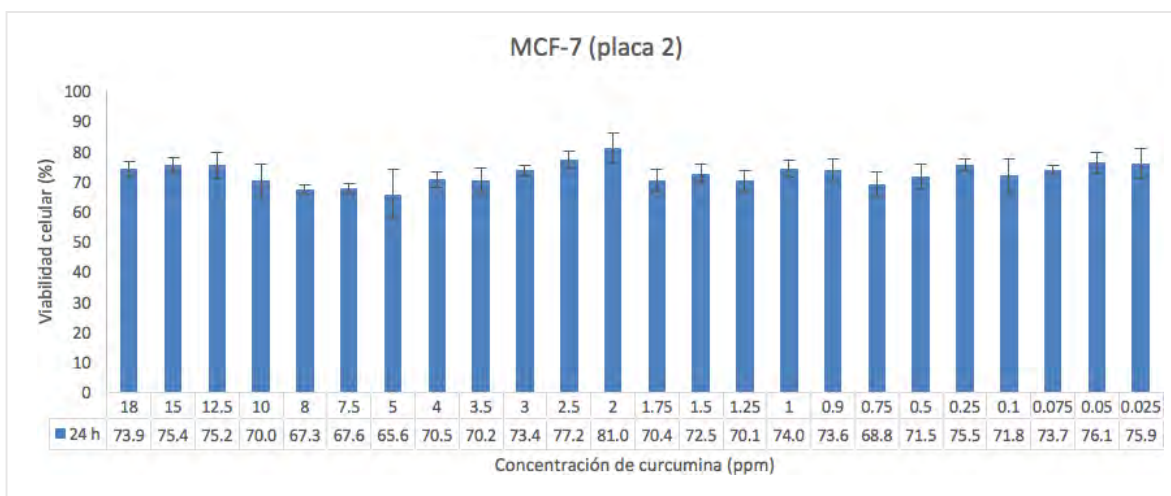


Figura 21. Viabilidad celular de células MCF-7 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 65.6 y 81.0%, con un promedio de viabilidad celular de 72.5%.

Tabla 6. Resultados de viabilidad celular de MCF-7 a las 24 h, determinados por MTT.

Tratamiento	Viabilidad celular de MCF-7 a 24 h					
	Porcentaje mínimo (%)	Desviación estándar	Porcentaje promedio (%)	Desviación estándar promedio	Porcentaje máximo (%)	Desviación estándar
Sistema magnetita-curcumina	58.7	2.84	66.9	2.86	73.9	2.17
Curcumina	69.0	4.68	75.4	4.31	84.6	5.21

MS-5

La Figura 22 muestra viabilidades celulares altas respecto al tratamiento con magnetita de cultivos celulares de MS-5, las cuales están entre 84.8 y 98.8%, con un promedio de viabilidad celular de 91.8%; donde el menor porcentaje fue logrado con una concentración de 5 ppm de magnetita y la menor concentración (0.025 ppm) presenta una elevada desviación estándar. Estos resultados no muestran una relación proporcional entre la concentración de magnetita y la reducción de la viabilidad celular.

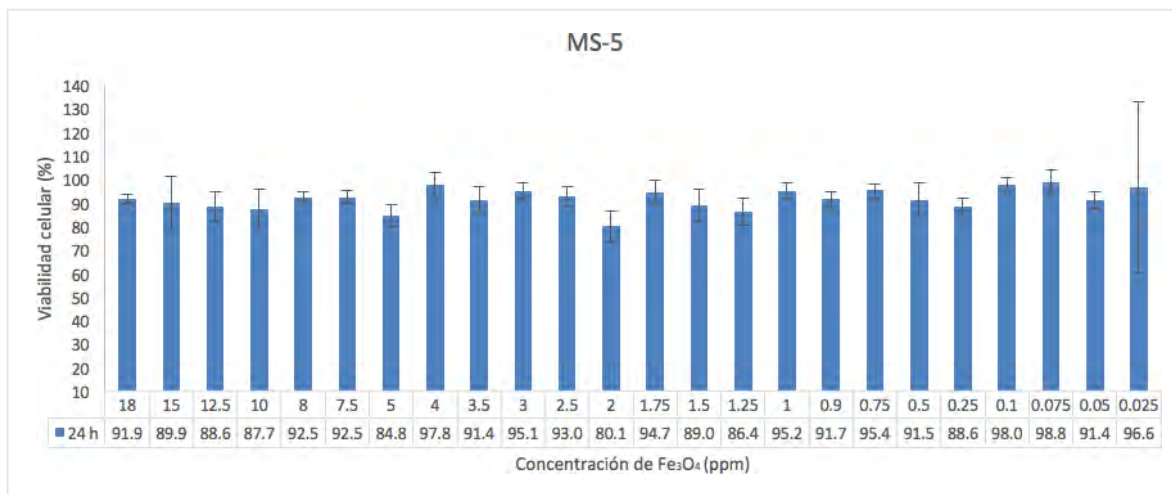


Figura 22. Viabilidad celular de células MS-5 después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones de magnetita (Fe₃O₄). Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 84.8 y 98.8%, con un promedio de viabilidad celular de 91.8%.

Las Figuras 23 y 24 presentan la viabilidad celular de MS-5 tratadas con el sistema magnetita-curcumina, donde en la primera se obtuvieron viabilidades celulares que oscilan entre 61.6 y 75.7%, con un promedio de 67.1%; mientras que en la Figura 24 se encuentran entre 62.8 y

75.2%, con un promedio de viabilidad celular de 68.5%. Al promediar ambas gráficas se obtiene una viabilidad celular promedio de 67.8% con una desviación estándar promedio de ± 3.51 (Tabla 7). No se observa una relación proporcional entre las concentraciones y la reducción de la viabilidad celular.

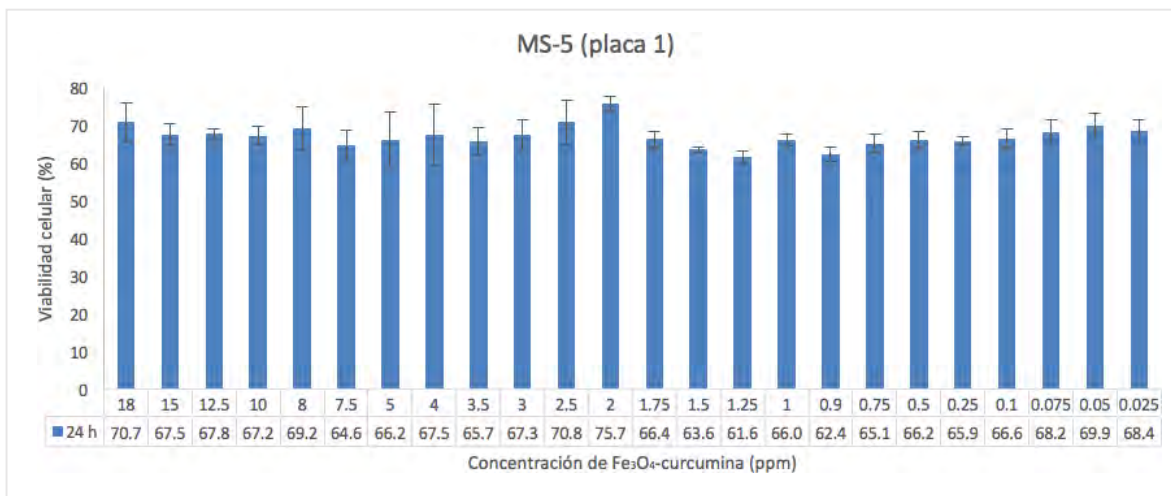


Figura 23. Viabilidad celular de células MS-5 de la placa 1, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 61.6 y 75.7%, con un promedio de viabilidad celular de 67.1%.

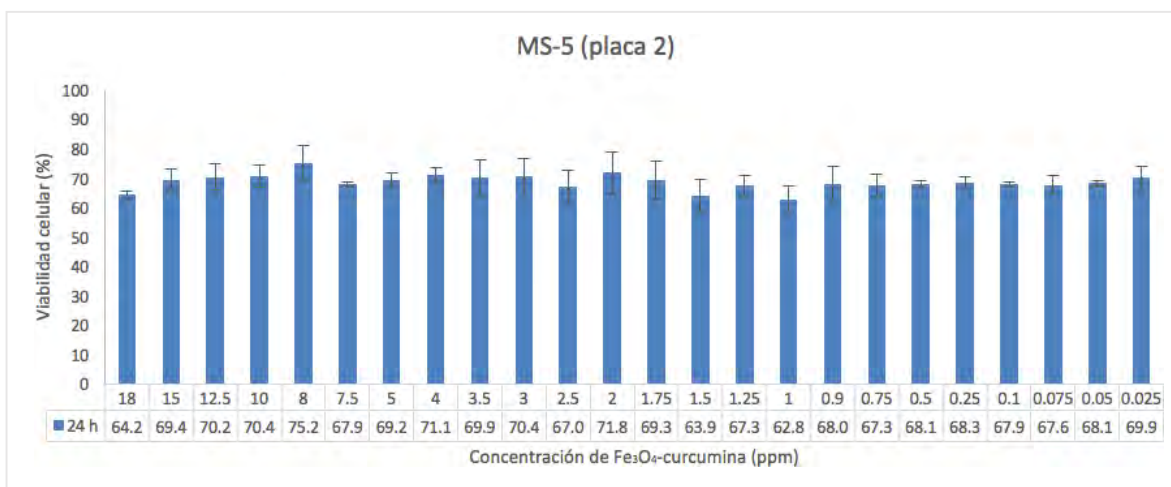


Figura 24. Viabilidad celular de células MS-5 de la placa 2, después de ser tratadas con 24 diferentes concentraciones del sistema Fe₃O₄-curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 62.8 y 75.2%, con un promedio de viabilidad celular de 68.5%.

Por otro lado, la Figura 25 presenta la disminución en la viabilidad celular de MS-5 al ser tratada con curcumina, observándose porcentajes de entre 54.3 y 76.0% y un promedio de viabilidad celular de 66.4%; siendo que tampoco se muestra una relación proporcional entre las concentraciones de curcumina y la viabilidad celular.

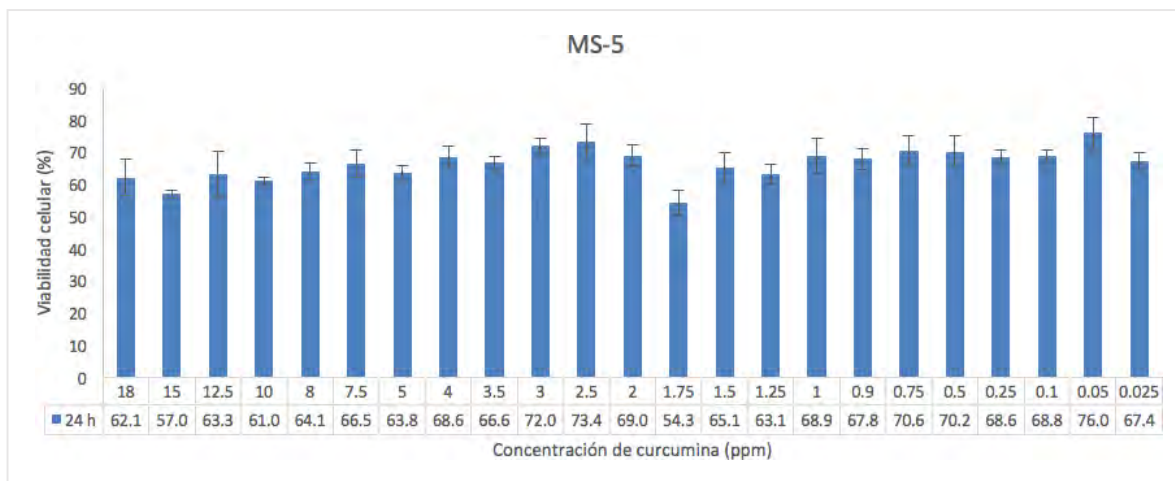


Figura 25. Viabilidad celular de células MS-5, después de ser tratadas con 23 diferentes concentraciones de curcumina. Para todas las concentraciones se observan viabilidades celulares que oscilan entre 54.3 y 76.0%, con un promedio de viabilidad celular de 66.4%.

Tabla 7. Resultados de viabilidad celular de MS-5 a las 24 h, determinados por MTT.

Viabilidad celular de MS-5 a 24 h						
Tratamiento	Porcentaje mínimo (%)	Desviación estándar	Porcentaje promedio (%)	Desviación estándar promedio	Porcentaje máximo (%)	Desviación estándar
Sistema magnetita-curcumina	62.2	3.05	67.8	3.51	75.5	38.6
Nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄)	84.8	4.62	91.8	6.16	98.8	5.11
Curcumina	54.3	3.76	66.4	3.50	76.0	4.74

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Respecto a los resultados obtenidos en la caracterización, el espectro de IR del sistema magnetita-curcumina (Figura 6) muestra las bandas características tanto de la magnetita (vibración Fe-O a 570 cm^{-1}) como de la curcumina (por ejemplo: la vibración de estiramiento de los anillos bencénicos a 1590 cm^{-1} y las vibraciones C=C y C=O a 1500 cm^{-1}); lo cual confirma que, en efecto, las nanopartículas de magnetita fueron correctamente funcionalizadas con curcumina. Estos resultados coinciden con las bandas reportadas por Devkota et al. (2013), quienes sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina y alginato, así como con Minutti (2018) que igualmente funcionalizó nanopartículas de magnetita con curcumina; aunque la banda característica de los fenoles a 3500 cm^{-1} no se observó en el espectro obtenido para nuestro sistema magnetita-curcumina.

En cuanto al TGA y DTA, se tiene que la Figura 8 muestra una caída a $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondiente a la pérdida de masa de la curcumina, confirmada por un pico indicativo de un proceso exotérmico aproximadamente a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$; además de que el primer valor es cercano al punto de fusión de la curcumina, el cual es de $173\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos resultados son similares a los reportados por Minutti (2018). Mientras que el TG del sistema magnetita-curcumina (Figura 10) muestra el inicio de pérdida de masa a $208.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual solo puede estar asociada a la curcumina debido a que la magnetita es estable en el rango de temperatura evaluado (20 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dado que solo se presenta una caída en el TG y que esta ocurre a una temperatura muy superior al punto de fusión de la curcumina, ello indica que las nanopartículas de magnetita fueron exitosamente funcionalizadas con curcumina; siendo que, además, la pérdida de masa fue de aproximadamente 6% en el rango de 20 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, señalando esto que el sistema magnetita-curcumina es estable en este intervalo y que tiene un buen rendimiento. Este resultado de TG del sistema magnetita-curcumina contrasta un poco con lo observado por Minutti (2018) debido a que en su espectro se presentan tres caídas asociadas a la pérdida de masa de la curcumina.

Por otro lado, el DLS (Figura 7) indica que las nanopartículas funcionalizadas con curcumina tienen un tamaño de entre 76.7 y 192.7 nm , predominando aquellas de 76.7 nm ; es decir, la mayoría de las nanopartículas tiene un tamaño uniforme. Además, estos resultados fueron confirmados mediante la micrografía obtenida por SEM (Figura 12), en donde se

aprecia que el sistema magnetita-curcumina presenta un tamaño de alrededor de 20-30 nm y este tamaño en comparación con las imágenes SEM de las nanopartículas de magnetita solas (Figura 11: a y b), puede explicarse por la funcionalización con curcumina puesto que se relaciona con el depósito de la curcumina, que ejerce un efecto estabilizador que evita la agregación de las nanopartículas. Adicionalmente, el análisis por SEM muestra que la forma de las nanopartículas de magnetita tanto solas como funcionalizadas (Figuras 11 y 12) es quasiesférica. En torno a estos resultados, cabe mencionar que el tamaño de las nanopartículas funcionalizadas con curcumina es menor al obtenido por Minutti (2018), siendo que el diámetro de sus partículas estuvo en el rango de 101.8 a 1,213 nm; además de que estas presentaron una mayor variación de tamaño a diferencia de las sintetizadas para esta investigación.

En referencia a los resultados obtenidos en los ensayos MTT para MDA-MB-231 (Tabla 5), se observaron los siguientes valores de viabilidad celular promedio: 78.4% (± 4.79) para el tratamiento con el sistema magnetita-curcumina, 77.6% (± 3.32) con las nanopartículas de magnetita y 86.4% (± 3.31) con curcumina. Estos resultados señalan que el mayor efecto citotóxico se presentó con las nanopartículas de magnetita solas, aunque la diferencia con el sistema magnetita-curcumina es de 0.8% de viabilidad celular. De cualquier forma, el efecto citotóxico observado a las 24 h con los tres tratamientos es mínimo, ya que únicamente se logró la muerte celular del 21.6% con el sistema magnetita-curcumina, del 22.4% con las nanopartículas de magnetita solas y del 13.6% con la curcumina. Mientras que para MCF-7 se obtuvo una viabilidad celular promedio de 66.9% (± 2.86) para el tratamiento con el sistema magnetita-curcumina y de 75.4% (± 4.31) con curcumina (Tabla 6); es decir, las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina mostraron un mayor efecto citotóxico, al matar al 33.1% de las células MCF-7 en 24 h.

Ahora bien, al comparar estos resultados con lo reportado en la literatura, se tiene que para el caso de la curcumina sola, su efecto citotóxico ya ha sido observado en células de cáncer de mama; destacando el estudio realizado por Lv et al. (2014) en el cual células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron tratadas con curcumina, mostrándose su efecto antitumoral en ambas al inducir la apoptosis. Asimismo, Sun et al. (2012) encontraron que la curcumina inhibe la proliferación de células MDA-MB-231, mismo que probablemente fue mediado por la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas

en inglés). Sin embargo, en ambos estudios a medida que aumentaba la concentración de curcumina, su efecto citotóxico incrementaba tanto en MDA-MB-231 como en MCF-7; lo cual era lo esperado y no se observó en la presente investigación.

En lo que respecta a los resultados obtenidos con el sistema magnetita-curcumina, algunos estudios han demostrado el efecto antiproliferativo de nanopartículas magnéticas conjugadas con curcumina. Un ejemplo es la investigación realizada por Song et al. (2017), quienes diseñaron nanopartículas magnéticas con un núcleo de fibroína de seda, las cuales fueron cargadas con curcumina; mejorando la capacidad antiproliferativa de la curcumina sobre células MDA-MB-231 puesto que este sistema permitió incrementar la internalización de curcumina y su citotoxicidad, siendo esta última dependiente de la dosis y del tiempo ya que la viabilidad celular se evaluó a los 3 días. De manera similar, Song et al. (2018) funcionalizaron nanopartículas magnéticas con alginato y quitosán y las cargaron con curcumina, observando una mayor citotoxicidad dependiente de la dosis sobre células MDA-MB-231.

Mientras que Saikia et al. (2017) funcionalizaron nanopartículas de magnetita con ácido fólico, ZnO y curcumina, permitiendo un mayor efecto citotóxico en comparación con las nanopartículas solas y la curcumina sola; siendo esto reflejado en un 58% de viabilidad celular para las células MCF-7 tratadas con dicho sistema y en un 80% para la curcumina sola, a las 48 h. Si bien, en estos tres estudios la viabilidad celular fue evaluada a tiempos superiores a las 24 h, en todos ellos el efecto citotóxico de los sistemas de nanopartículas fue dependiente de la dosis; lo cual no se observó para el sistema magnetita-curcumina probado en la presente investigación.

Por otra parte, en los resultados de MTT para MS-5 (Tabla 7) se obtuvieron los siguientes porcentajes de viabilidad celular: 67.8% (± 3.51) para el sistema magnetita-curcumina, 91.8% (± 6.16) para las nanopartículas de magnetita sola y 66.4% (± 3.50) para el tratamiento con curcumina. Esto indica que el mayor efecto citotóxico a las 24 h fue el ejercido por la curcumina, seguido por el sistema magnetita-curcumina; siendo la diferencia en viabilidad celular de 1.4%, donde las nanopartículas funcionalizadas con curcumina lograron la muerte celular en el 32.2% de las células MS-5. Estos resultados señalan que el sistema magnetita curcumina no es específico para las células de cáncer de mama, puesto que causó un considerable efecto citotóxico en el control de células sanas en 24 h. Además, podría

ser sugestivo de que para las células sanas, la ruta que permite la internalización de la curcumina (e incrementar su efecto citotóxico) es mejor que la involucrada en los cultivos de células cancerosas.

Así pues, estos resultados muestran que el sistema magnetita-curcumina tuvo un mayor efecto citotóxico en las células MCF-7 (33.1%), seguidas por MS-5 (32.2%) y, finalmente, en MDA-MB-231 con un 21.6% de muerte celular. Aunque dicho efecto fue superado por aquel ejercido por la magnetita sola en el caso de MDA-MB-231 y por curcumina en MS-5. Esto también indica que las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina no poseen una actividad citotóxica específica por las células cancerígenas, lo cual representaría una limitante para la implementación de este sistema en el área clínica, ya que afectaría a las células sanas; mismo que ya constituye una reacción adversa común y la principal problemática de la quimioterapia actualmente usada en el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, esto podría superarse al agregar a la superficie de las nanopartículas algún ligando que permitiera la internalización selectiva de la curcumina por células cancerígenas, tal como reportaron Hayashi et al. (2010) al añadir folato a sus nanopartículas de óxido de hierro.

Asimismo, cabe destacar que los resultados recabados, en general, fueron inconsistentes o variados; ya que los porcentajes de viabilidad celular obtenidos para cada línea celular sometida a los diferentes tratamientos no mostraron una relación de proporcionalidad directa o dependiente de la dosis entre el aumento de las concentraciones de magnetita, curcumina o el sistema magnetita-curcumina y la reducción de la viabilidad celular. Esto se vio reflejado en la mayoría de los tratamientos, en donde la mayor concentración evaluada (18 ppm) no siempre correspondía con el mayor efecto citotóxico, ni la menor concentración con el menor efecto citotóxico; además de que el efecto citotóxico observado con el sistema magnetita-curcumina para MDA-MB-231 y MCF-7 fue mínimo.

Aunado a esto, el número de placas tratadas para cada línea celular y condición (nanopartículas de magnetita, sistema magnetita-curcumina y curcumina sola) fue limitado y únicamente permitió medir la viabilidad celular a las 24 h; siendo que también se necesitaría que el efecto citotóxico se evaluara a las 48 y 72 h. Al respecto, cabe mencionar que esto se debió a la pandemia por COVID-19, la cual imposibilitó continuar con los experimentos en el laboratorio de la UDLAP. No obstante, es claro que la funcionalización de nanopartículas

de magnetita con curcumina estabiliza a la curcumina, incrementando su internalización por parte de las células cancerígenas y, por ende, aumenta su efecto citotóxico. Por lo tanto, sería interesante continuar con la investigación para tener resultados que permitan dilucidar objetivamente la actividad anticancerígena del sistema magnetita-curcumina en células de cáncer de mama.

CONCLUSIONES

Mediante esta investigación fue posible funcionalizar óptimamente nanopartículas de magnetita con curcumina, siendo esto evidenciado por los resultados de caracterización obtenidos por FTIR, TGA, DLS y SEM. Asimismo, se pudo evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas de magnetita y la curcumina de manera independiente, así como del sistema magnetita-curcumina sobre dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231 y MCF-7, usando como control de células sanas a MS-5. En este sentido, se observó que el sistema magnetita-curcumina ejerció un mayor efecto antiproliferativo en MCF-7, aunque el efecto citotóxico de las nanopartículas de magnetita solas y de la curcumina fue superior en MDA-MB-231 y MS-5, respectivamente. Esto también indicó que el sistema magnetita-curcumina no tiene especificidad por las células de cáncer de mama, aunque esta limitante podría superarse mediante la modificación superficial del sistema.

Finalmente, cabe mencionar que estos resultados no se consideran conclusivos o definitivos debido a que fueron inconsistentes y, además, no fue posible terminar los experimentos de MTT para obtener tales resultados por triplicado y que fueran estadísticamente significativos. Lo anterior, derivado de la pandemia causada por la COVID-19. Sin embargo, los resultados recabados son interesantes puesto que resaltan el efecto anticancerígeno de la curcumina y de esta como parte del sistema magnetita-curcumina, siendo que en este último su efecto citotóxico podría verse potenciado, tal como han señalado otros autores. Por lo tanto, sería importante continuar con la investigación con el objetivo de conocer con certeza el efecto citotóxico de las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina en cáncer de mama.

PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto citotóxico del sistema magnetita-curcumina mediante MTT a las 48 y 72 horas para las mismas concentraciones evaluadas a las 24 horas, para las tres líneas celulares (MDA-MB-231, MCF-7 y MS-5). Esto, debido a que la curcumina tiene muy baja solubilidad y los procesos de “liberación”/solubilización en este tipo de sistemas pueden tomar tiempo.
- Determinar los mecanismos moleculares por los cuales el sistema magnetita-curcumina ejerce su efecto citotóxico en MDA-MB-231, MCF-7 y MS-5. Al respecto, podría comenzarse realizando un ensayo de tinción de DNA nuclear para medir la apoptosis.
- Medir en tiempo real y a diferentes tiempos, la concentración del sistema magnetita-curcumina que es internalizada por las tres líneas celulares.
- Incluir doxorubicina como control positivo en futuros ensayos, para poder evaluar de manera más óptima los efectos citotóxicos de los tratamientos.
- Considerar la implementación de otros métodos para medir la viabilidad celular, para evitar posibles interferencias con la curcumina; por ejemplo, la citometría de flujo.

REFERENCIAS

- Acosta, L. S.; Arenas, M. C.; García, R. & Rodríguez, M. P. (2019). *Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas*. https://www.researchgate.net/publication/336348823_Manual_para_la_ensenanza_practica_del_ENSAYO_MTT_PARA_EVALUAR_LA_CITOTOXICIDAD_DE_NANOPARTICULAS
- Ahmed, M. & Douek, M. (2013). The Role of Magnetic Nanoparticles in the Localization and Treatment of Breast Cancer. *BioMed Research International*, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/281230>
- Akram, M.; Iqbal, M.; Daniyal, M. & Khan, A. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer; *Biol Res*, 50 (33): 1-23. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- ATCC. (2011). *MCF-7 (ATCC® HTB-22™)*. <https://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#generalinformation>
- ATCC. (2014). *MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)*. <https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation>
- Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M. & Rizzolio, F. (2020). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(112). Doi: 10.3390/molecules25010112
- Breastcancer.org. (2018). *Breast cancer*. <https://www.breastcancer.org>
- CDC. (2018). *Basic Information About Breast Cancer*. https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/
- Devkota, J.; Mai, T.; Stojak, K.; Ha, P. T.; Pham, H. N.; Nguyen, X. P.; Mukherjee, P.; Srikanth, H. & Phan, M. H. (2013). Synthesis, inductive heating, and magnetoimpedance-based detection of multifunctional Fe₃O₄ nanoconjugates. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190: 715-722. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.033>
- DSMZ. (2015). *MS-5*. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-441>
- González-Albadalejo, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81(4): 278-310. https://analesranf.com/wp-content/uploads/2015/81_04/8104_02.pdf

- Hayashi, K., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Moriya, M., Sakamoto, W., & Yogo, T. (2010). High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS applied materials & interfaces*, 2(7), 1903–1911. <https://doi.org/10.1021/am100237p>
- Ito, A.; Kuga, Y.; Honda, H.; et al. (2004). Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Letters*, 212(2): 167–175, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.03.038>
- Jain, T. K.; Morales, M. A.; Sahoo, S. K.; Leslie-Pelecky, D. L. & Labhasetwar, V. (2005). Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Molecular Pharmaceutics*, 2(3): 194–205. Doi: 10.1021/mp0500014
- Kikumori, T., Kobayashi, T., Sawaki, M., & Imai, T. (2009). Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast cancer research and treatment*, 113(3), 435–441. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9948-x>
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). *Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 271–297. doi:10.1016/b978-0-12-809286-6.00010-8
- Lee, J. J.; Yazan, L. S. & Abdullah, C. A. (2017). A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 12: 2373-2384. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S127329>
- Lv, Z. D., Liu, X. P., Zhao, W. J., Dong, Q., Li, F. N., Wang, H. B., & Kong, B. (2014). Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(6), 2818–2824.
- Minutti López Sierra, A. (2018). *Nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina: evaluación de actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama*. [Tesis de Licenciatura] Universidad de las Américas Puebla. Derechos Reservados © 2018.
- Pecorino, L. (2016). *Molecular biology of cancer* (4th Ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Pelengaris, S., & Khan, M. (2013). *The Molecular Biology of Cancer. A Bridge from Bench to Bedside*. (2nd Ed.). Hoboken, NJ.: Wiley-Blackwell.

- Saikia, C.; Das, M. K.; Ramteke, A. & Maji, T. K. (2017). Evaluation of folic acid tagged aminated starch/ZnO coated iron oxidenanoparticles as targeted curcumin delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 157: 391-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.087>
- Schulz, W. (2005). *Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook*. Dordrecht: Springer.
- Shindikar, A.; Singh, A.; Nobre, M. & Kirolikar, S. (2016). Curcumin and Resveratrol as Promising Natural Remedies with Nanomedicine Approach for the Effective Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Oncology*, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9750785>
- Song, W.; Muthana, M.; Mukherjee, J.; Falconer, R. J.; Biggs, C. A. & Zhao, X. (2017). Magnetic-Silk Core-Shell Nanoparticles as Potential Carriers for Targeted Delivery of Curcumin into Human Breast Cancer Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.*; 3: 1027-1038. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00153>
- Song, W.; Su, X.; Gregory, D. A.; Li, W.; Cai, Z. & Zhao, X. (2018). Magnetic Alginate/Chitosan Nanoparticles for Targeted Delivery of Curcumin into Human Breast Cancer Cells. *Nanomaterials*, 8(907). <https://doi.org/10.3390/nano8110907>
- Sun, X., Liu, X., & Huang, D. (2012). Curcumin induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by inhibition of EGFR expression. *Molecular Medicine Reports*, 6, 1267-1270. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1103>
- Wallyn, J.; Anton, N. & Vandamme, T. E. (2019). Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications—A Review. *Pharmaceutics*, 11(601), 1-29. Doi: 10.3390/pharmaceutics11110601
- Wang, Y.; Yu, J.; Cui, R.; Lin, J. & Ding, X. (2016). Curcumin in Treating Breast Cancer: A Review. *Journal of Laboratory Automation*, 21(6), 723-731. <https://doi.org/10.1177/2211068216655524>
- Weinberg, R. (2014). *The biology of cancer* (2nd Ed.). New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- WHO. (2020). *Cancer Country Profile 2020: Mexico*. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category

[ry_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270&lang=es](#)

Wu, D.; Si, M.; Xue, h. & Wong, H. (2017). Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. *International Journal of Nanomedicine*, 12: 5879-5892. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S123437>