



## Study of the effect of large volumes of chitosan on different murine organs, to be administered daily for two weeks

**Title in Spanish:** *Estudio del efecto de grandes volúmenes de nanopartículas de quitosano sobre diferentes órganos murinos, al ser administradas diariamente durante dos semanas*

Verónica Castro Bear<sup>2</sup>, Enrique R. Ángeles Anguiano<sup>3</sup>, Sandra Díaz-Barriga Arceo<sup>4</sup>, Óscar Zúñiga Lemus<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Farmacobiología, Universidad de la Cañada, Oaxaca, Teotitlán de Flores Magón, México. <sup>2</sup>Universidad Leonardo da Vinci, Tehuacán, Puebla. <sup>3</sup>Laboratorio de Química Medicinal, Departamento de Ciencias Químicas FESC, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México. <sup>4</sup>Laboratorio de Toxicología y Genética, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, México.

**ABSTRACT:** Aim: Chitosan nanoparticles have been used on different pharmaceutical formulations, however there is not data important that show if these structures are toxic. In this work we studied the acute toxicity of chitosan nanoparticles. Methods: We used mice BALB/c, the chitosan nanoparticles was administrated intraperitoneal via by 15 day after these, the mice was sacrifice by cervical dislocation and the organs were treated for histological analysis using HE stain. Results: The histological results showed that chitosan nanoparticles causes damage on heart, liver, spleen, intestine and kidney in mouse BALB/c male. Conclusion: The exposure at chitosan nanoparticles causes histological damage on heart, liver, spleen, intestine and kidney.

**RESUMEN:** Objetivo. Las nanopartículas de quitosano han sido usadas recientemente en diversas formulaciones farmacéuticas, este trabajo evaluó la toxicidad que pueden presentar estas estructuras. Material y Métodos. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c administrados durante 15 días con nanopartículas de manera intraperitoneal posterior a lo cual se sacrificaron, obtuvieron diversos órganos y trataron para su análisis. Resultados: Los resultados muestran que las nanopartículas de quitosano presentan toxicidad en ratones machos, ya que pueden dañar corazón, intestino, riñón, bazo e hígado. Conclusión: La exposición a nanopartículas de quitosano causó daño histológico sobre corazón, hígado, bazo, intestinos y riñón.

\*Corresponding Author: oszulemus@hotmail.com

Received: July 7, 2016 Accepted: September 27, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 3 (2016), pp. 270-273

Language of Manuscript: Spanish

### 1. INTRODUCCIÓN

El empleo de sistemas de transporte de fármacos con liberación controlada con alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación, sin efectos tóxicos, es un modelo ideal que se investiga con el uso de nanopartículas (1). Los liposomas, dendrímeros, microcápsulas, etc., son algunas de las nanopartículas que se han utilizado en el transporte de fármacos, porque pueden imitar o modificar procesos biológicos que ayudan a solucionar problemas de solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de algunos medicamentos (2). Se ha propuesto que las preparaciones de nanopartículas a base de polímeros naturales presentan mayor biodegradabilidad y, en consecuencia, menor toxicidad (3). Entre los diversos polímeros naturales biodegradables disponibles se encuentra el quitosano (2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa) (4), el cual sirve como una matriz de administración de fármacos debido a su naturaleza química y la permeabilidad en sistemas *in vivo*

e *in vitro* (5).

Las nanopartículas han sido ampliamente utilizadas como transporte de moléculas pequeñas, péptidos (6), vacunas (7) y genes (8), a través de las mucosas (9), por vía tópica (10), parenteral (11), entre otros usos. No obstante, aunque el quitosano se considera generalmente no tóxico, hay reportes que indican que la perfusión con 250 mg/mL de una solución de nanopartículas causa cambios morfológicos en las microvellosidades intestinales de ratas, incrementando la secreción de mucina en las células caliciformes (12). Aun cuando la utilización de quitosano como sistema de transporte de fármacos de liberación controlada representa una alternativa con futuro en la industria farmacéutica, la investigación realizada en relación a sus posibles efectos tóxicos ha sido poca e insuficiente, y se desconocen la mayor parte de sus posibles efectos adversos.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar si las nanopartículas de quitosano presentan un

efecto toxicológico al exponer ratones de la cepa BALB/c a estas estructuras, basándonos es un análisis histológico de órganos como son: corazón, hígado, bazo, riñones e intestinos delgado (ID) y grueso (IG).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación de nanopartículas

Las nanopartículas se prepararon disolviendo el quitosano en ácido acético al 1 %, una vez preparadas se mezclaron con tripolifosfato (TPP) en concentración 0.3 % hasta alcanzar una proporción 3:1 (TTP:quitosano), para tener una concentración final de 0.15 % de TTP y 0.05 % de quitosano. A esta solución se le ajustó el pH hasta 5.2 con PBS 1X pH 7.4. Dejando en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de su uso, las nanopartículas se esterilizaron por filtración con un poro de 0.22  $\mu$ M. Para la caracterización de estas estructuras se usó microscopía electrónica de transmisión (JEM 2010), con la finalidad de obtener una imagen definida de las mismas.

### 2.2. Exposición de las nanopartículas

Se utilizaron ratones machos de la raza BALB/c con una edad de 5 semanas, los cuales fueron alimentados con agua y alimento *ad libitum* manteniendo una temperatura y humedad contralada con exposición de 12 por 12 horas de luz.

A los animales se les administró las nanopartículas de quitosano un volumen de 1mL/día por vía intraperitoneal durante un lapso de 14 días. Como control de experimentación se usó la solución de ácido acético sin nanopartículas a pH de 5.2 esterilizada por filtración.

### 2.3. Análisis histológico

Después de transcurrido el tiempo de exposición, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron corazón, hígado, bazo, riñones, intestino delgado y grueso. Los órganos obtenidos se fijaron en

formaldehído buferado al 4 %, posteriormente se deshidrataron en un gradiente de etanol hasta alcanzar el 100 %, el cual fue substituido por Xilol para embeber en parafina y su posterior corte al micrótopo. Los bloques de parafina fueron cortados de manera perpendicular al axis apical de los tejidos, en secciones de 1  $\text{cm}^3$ .

Los cortes en el micrótopo se realizaron de 3-5  $\mu$ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Finalmente fueron montados usando resina sintética y estudiados bajo el microscopio óptico a 40X, las fotografías obtenidas se tomaron usando una cámara comercial de la marca Canon®.

### 2.4. Ética

Los animales usados en este trabajo fueron manejados de acuerdo a la guía de “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publicación #85-23, revisado en 1985) y la “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)”, titulado “Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” con código NOM-062-ZOO-1999, el sacrificio de los animales se basó la Norma oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)”, titulado “Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres” con código NOM-033-SAG/ZOO-2014.

## 3. RESULTADOS

Nuestros resultados muestran una estructura densa y esférica de las nanopartículas de quitosano formadas en el procedimiento de síntesis de las mismas (Figura 1), con un tamaño de partícula de 173.9 nm, además es posible apreciar que las nanopartículas causan daño histológico sobre bazo, riñón, hígado, intestino grueso, intestino delgado y corazón.

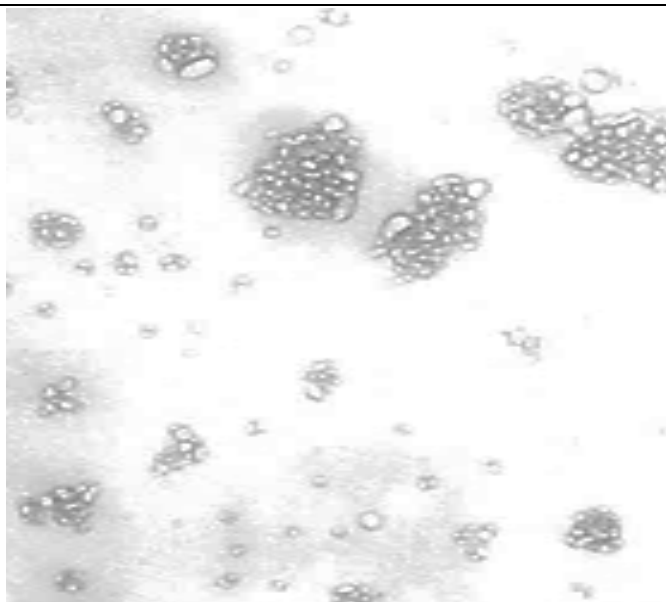
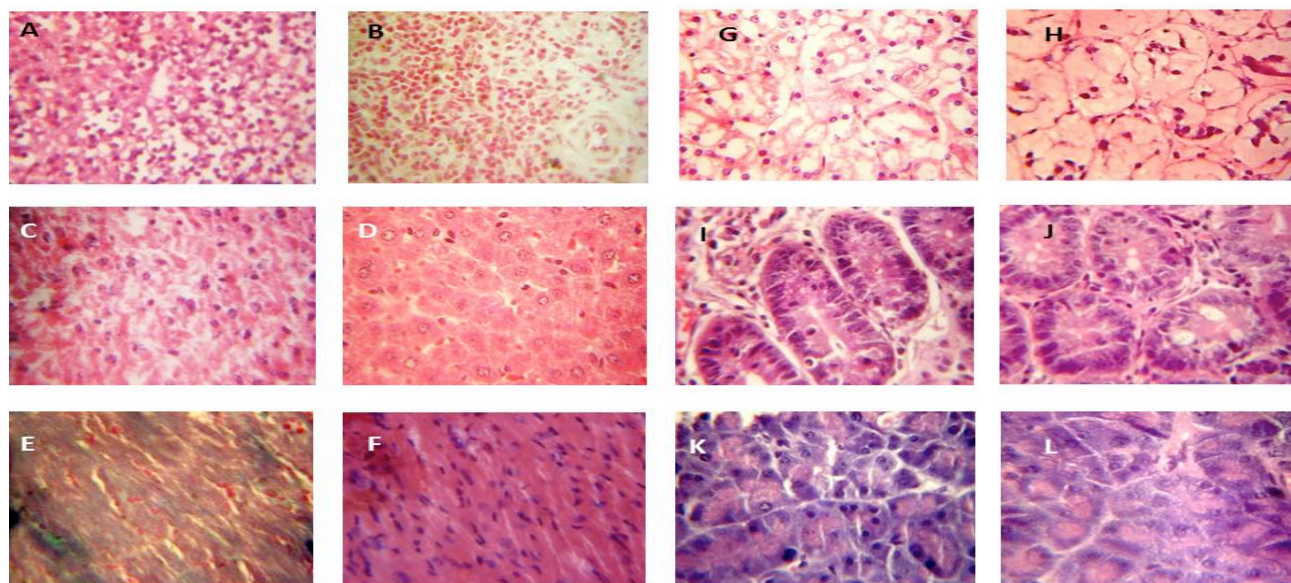


Figura 1. Fotografía por Microscopía Electrónica de Transmisión de nanopartículas de quitosano.

La Figura 2 muestra el efecto obtenido después de exponer los diversos órganos a las nanopartículas. La imagen 2A, 2C, 2E y 2G corresponden al bazo, hígado, corazón y riñón, respectivamente. Tratados con nanopartículas en estos órganos es posible apreciar un daño mayor al tratarse de órganos altamente irrigados. En el caso del hígado no es posible apreciar los hepatocitos con su forma poliédrica con núcleos más compactos al compararlos con el control (Figura 2D), lo que podría sugerir un posible proceso inflamatorio por la presencia de neutrófilos. En corazón es posible apreciar una desorganización del músculo cardíaco sin que los discos intercalantes sean visibles, además de la presencia de sangre en el tejido que puede ser indicativo de un daño

cardiotóxico (Figura 2E). En el caso del riñón (Figura 2H) es posible apreciar los túbulos contorneados distales, observándose el abundante citoplasma en su estructura característica principal de estas estructuras, lo cual no es posible apreciar en el tejido tratado con las nanopartículas (Figura 2G).

En la imagen del intestino grueso (Figura 2I) no es posible apreciar la morfología normal de las glándulas caliciformes, además de observar la presencia de sangre, lo cual no ocurre en el control (Imagen 2J). En el intestino delgado tratado con nanopartículas se puede apreciar un incremento en la cantidad de mucina que este órgano secreta (Figura 2K), lo cual no se aprecia en el tejido control (Figura 2L).



**Figura 2. Efecto histológico por exposición aguda a Nanopartículas de Quitosano (NPQ) en ratones BALB/c.** La Imagen A representa el bazo tratado con NPQ, la imagen B corresponde al bazo control, la imagen C corresponde al hígado tratado con NPQ, la imagen D representa al hígado control, la imagen E corresponde al corazón tratado con NPQ, la imagen F corresponde al corazón control, la imagen G corresponde al riñón tratado con NPQ, la imagen H representa al riñón control, la imagen I corresponde al intestino grueso (IG) tratado con NPQ, la imagen J al IG control, la imagen K al intestino delgado (ID) tratado con NPQ y la imagen L al ID control.

#### 4. DISCUSIÓN

Los mecanismos de toxicidad de las nanopartículas no han sido totalmente esclarecidos, aunque existen argumentos que sugieren que uno de los principales mecanismos de nanotoxicidad *in vivo* es la inducción de estrés oxidativo por generación de radicales libres e inflamación causados principalmente en nanopartículas metálicas (13).

El daño observado en el bazo puede deberse en parte a que este órgano está altamente irrigado y es parte importante del sistema inmune. Hay evidencia que propone que las células del sistema inmunológico participan en la distribución de nanopartículas en los diferentes órganos y los macrófagos pudiesen ser los responsables de transportar las nanopartículas dentro del organismo a través de diferentes barreras (14). Se ha descrito que la distribución de las nanopartículas depende de las propiedades de cada tipo de nanopartícula en particular y, que estando dentro de la célula, éstas podrían

concentrarse dentro del citoplasma o en organelos como los lisosomas, por lo tanto los efectos tóxicos que las nanopartículas pudieran producir serían en el orden de acumulación en los diferentes órganos y señalan el siguiente orden de acumulación: hígado > bazo > médula > cerebro (15), lo cual pudiera explicar el daño observado en los tejidos expuestos a las nanopartículas de quitosano en este estudio.

Las nanopartículas de quitosano son partículas que se han propuesto como una alternativa en el transporte de fármacos insolubles en agua debido a su tamaño, a su capacidad de atravesar barrera hematoencefálica e intestinal, así como por su alta biodisponibilidad y a que son polímeros biodegradables; sin embargo, hasta el momento no existe evidencia suficiente para considerar estas estructuras como seguras en su uso farmacológico. Nuestros resultados muestran que estas partículas en volúmenes grandes a una exposición subaguda son tóxicas, alterando la histología del corazón, hígado, bazo, intestino

y riñones.

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos podemos decir que las nanopartículas de quitosano son tóxicas al ser expuestas a grandes volúmenes en ratones de la cepa BALB/c ya que causan alteraciones histológicas en corazón, hígado, bazo, riñón, intestino delgado e intestino grueso.

## 6. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores aprobamos en su totalidad el contenido del trabajo (incluyendo cuadros y figuras), en caso de que el trabajo sea aceptado, manifestamos nuestra adhesión a los términos y condiciones estipulados en las Normas para la publicación de manuscritos en Salud Pública de México, por lo que estamos de acuerdo en transferir los derechos de autor sobre el mismo a Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, y autorizamos en consecuencia su reproducción en cualquier idioma y medio físico o electrónico, por sí o por medio de alguna otra persona física o moral a la que se otorgue la posibilidad de reproducción. Declaramos que el artículo sometido es original y no ha sido publicado total o parcialmente; tampoco se ha sometido para su publicación por ninguno de los coautores ni por otros autores de manera simultánea a ninguna otra revista nacional o extranjera.

El artículo no contiene material que pudiera violar los derechos de autor de un tercero. En caso de que exista material que haya sido previamente publicado (e.g., figuras, cuadros), se da el crédito correspondiente al autor y la fuente originales y se anexará, en caso de aceptación, el permiso para reproducirlo. Por lo cual los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

## 7. AGRADECIMIENTOS

CONACyT, Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina-UNAM. PAPIIT IT200614, Cátedra PACIFE: Diseño de moléculas bioactivas.

Cuerpo Académico de Farmacología Computacional-UNCA.

Oscar Zuñiga is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship from CONACYT.

## 8. REFERENCIAS

1. Zhang L, Gu FX, Chan JM, *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(5):761-9
2. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B* 2010; 75(1):1-18
3. Kumar SS, Kumar PA. Toxicological and Regulatory Consideration of Pharmaceutically Important Nanoparticles. *J Curr Pharma Res* 2010; 3(1): 8-12
4. Majeti NVRK. A review: chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46(1), 1-27

5. Lee DW, Powers K, Baney R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2004; 58:371-7.
6. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, *et al.* Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(1):59-82
7. Sayin B, Somavarapu S, Li XW, *et al.* Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery. *Int J Pharm* 2008; 363(1-2):139-48
8. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52(2):145-50
9. Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, *et al.* Chitosan and its salts for mucosal and transmucosal delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6(9):923-39
10. dos Santos KS, Coelho JF, Ferreira P, *et al.* Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. *Int J Pharm* 2006; 310(1-2):37-45
11. Kim JH, Kim YS, Park K, *et al.* Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release* 2008; 127(1):41-9
12. Schipper NG, Varum KM, Stenberg P. Chitosan as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: influence of mucus on absorption enhancement. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8: 335-43
13. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32(36): 9810-7
14. Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, *et al.* Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol* 2007; 4:10-7.
15. Monteiro-Riviere NA, Tran L. *Nanotoxicology, Characterization, dosing and health effects*, Florida: Editorial CRC Press 2007; pp 392 -399.