

## Estudios de absorción de hierro en liposomas mediante cultivos celulares

Hermida, L.<sup>(i)</sup>; Dománico, R.<sup>(i)</sup>; Sabés, M.<sup>(ii)</sup>; Barnadas, R.<sup>(ii)</sup>

<sup>(i)</sup> INTI-Química

<sup>(ii)</sup> Unidad de Biofísica – Universidad Autónoma de Barcelona - España

### Introducción

La anemia por deficiencia de hierro es un problema difundido alrededor del mundo, fundamentalmente en los países en vías de desarrollo, en los que afecta a un alto porcentaje de la población.

Los estudios de absorción de hierro son fundamentales a la hora de evaluar la eficacia de una formulación y los modelos propuestos para evaluarla son numerosos: estudios de solubilidad, modelos aritméticos, estudios en animales, en humanos y estudios de absorción con cultivos celulares <sup>[1]</sup>.

Los cultivos de células Caco-2 se han empleado para estudios de absorción de hierro desde principios de los 90. Esta línea celular, proveniente de carcinoma de colon humano, se diferencia espontáneamente exhibiendo muchas de las características de las células del epitelio intestinal humano. De esta forma, los resultados obtenidos tienen una buena correlación con las medidas de absorción en humanos para diversas combinaciones de alimentos <sup>[2]</sup>.

El objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de la absorción de hierro mediante cultivos de Caco-2, después de incubaciones con sulfato ferroso incorporado a liposomas de distinta composición, antes o después de procesos de digestión simulada. La idea fue evaluar su potencial como sistemas de liberación controlada para administración por vía oral.

### Metodología

#### Preparación de liposomas:

Se emplearon materias primas grado alimenticio y procesos transferibles a escala industrial.

Se prepararon tres modelos de liposomas con distinta composición lipídica:

- Fosfatidilcolina de soja (SPC)
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)
- HSPC – colesterol (3:2) molar (HSPC-chol).

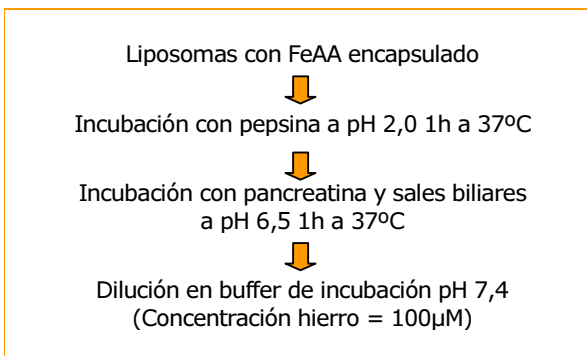
En todos los casos se incorporó hierro a una concentración de 0,24M como sulfato ferroso

heptahidrato, estabilizado con ácido ascórbico en relación 1:2 molar.

Los liposomas fueron preparados mediante homogeneización de alta presión, empleando un equipo Microfluidizer 110S escala laboratorio, operando por ciclos <sup>[3]</sup>.

#### Digestión simulada de liposomas

Los liposomas conteniendo hierro – ácido ascórbico (FeAA) se separaron del hierro no encapsulado por cromatografía de exclusión molecular. Luego, se sometieron a un proceso de digestión simulada adaptado de la bibliografía <sup>[4]</sup>:



#### Cultivos celulares

Se emplearon células Caco-2 provenientes de la European Collection of Cell Cultures (ECCC) que fueron cultivadas según bibliografía <sup>[5]</sup>. El ensayo con liposomas se realizó entre los 12 y 15 días después de la siembra, habiéndose verificado la confluencia entre ellas.

#### Incubación de células con liposomas

Las células se incubaron 1h a 37°C con las distintas formulaciones, sometidas o no a la digestión simulada. Como blanco se emplearon células incubadas con buffer de incubación pH 7,4 y como referencia, células incubadas con una solución de FeAA.

Las especies insolubles de hierro adsorbidas sobre las células, fueron lavadas con un reactivo

específico (batofenantrolina) que forma un complejo con el hierro <sup>[5]</sup>.

#### Análisis de hierro por absorción atómica

Las células lavadas fueron suspendidas en tritón X-100 al 2% y luego sometidas a ultrasonido hasta obtener extractos homogéneos que fueron analizados por absorción atómica en horno de grafito.

#### Determinación de proteínas

El contenido de proteínas en los extractos celulares se determinó por el método BCA (BioRad), calibrando con albúmina de suero bovino.

#### Microscopía confocal

Se prepararon liposomas de HSPC-chol incorporando una sonda fluorescente (HPTS) y se incubaron con células Caco-2 1h a 37°C. Una vez lavadas, se evaluó mediante microscopía confocal la presencia de la sonda en el interior celular.

### Resultados

En la *Figura 1* se muestran los niveles de hierro incorporados a células incubadas con liposomas de distinta composición antes o después de ser sometidos al proceso de digestión simulada.

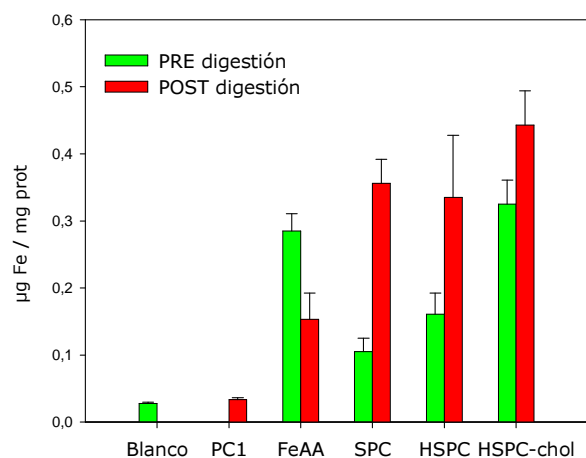


Fig. 1: Determinación del contenido de hierro en extractos celulares incubados con liposomas o hierro soluble pre y postdigestión. Los resultados se expresan como µg Fe / mg de proteína y son el promedio de al menos dos replicados independientes (n=3 para cada ensayo independiente). PC1: producto comercial N°1.

Con respecto a los resultados predigestión, únicamente la formulación HSPC-Chol resulta tan efectiva como la solución de FeAA.

Por el contrario, los liposomas digeridos muestran aumentos significativos en la captación celular de hierro respecto a la solución de FeAA y al producto comercial (PC1) digeridos.

La *Figura 2* muestra fotografías obtenidas mediante microscopía confocal, de células incubadas previamente con liposomas de HSPC-chol sin digerir. Se observa una clara distribución de la fluorescencia asociada a las células.

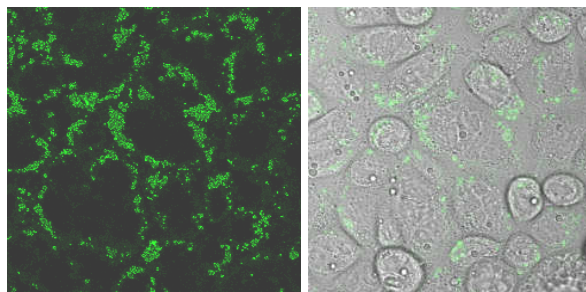


Fig. 2: Fotografías de células Caco-2 incubadas 1h a 37°C con liposomas HSPC-Chol conteniendo HPTS. En la fotografía izquierda se muestra la fluorescencia debida a la sonda HPTS y en la derecha la superposición de ésta con una microfotografía de las células Caco-2.

### Conclusiones

El trabajo realizado permite inferir que el hierro incorporado a estos tres modelos de liposomas es absorbido por células Caco-2, ya que en todos los casos los valores obtenidos superan el nivel basal.

Para liposomas sin digerir, sólo las células incubadas con HSPC-chol muestran niveles comparables al control de FeAA sin liposomar.

Por el contrario, en el caso de las formulaciones digeridas, las células incubadas con liposomas tienen contenidos de hierro significativamente superiores a la referencia (FeAA) y al producto comercial evaluado (comprimidos de sulfato ferroso con cubierta entérica).

Se observa además, que en el caso de todas las formulaciones de liposomas digeridas, la absorción de hierro por las células es superior a la obtenida cuando las formulaciones no se digieren. Estos resultados sugieren que el proceso digestivo favorece la biodisponibilidad del hierro encapsulado en liposomas, hecho que no tiene lugar en el caso del hierro soluble (FeAA).

### Referencias

- [1] Fairweather-Tait S.J. "Iron". J. Nutr. 131:1383-1386 (2001).
- [2] Au A., Reddy M. S. "Caco-2 cells can be used to assess human iron bioavailability from a semipurified meal". J. Nutr. 130:1329-1334 (2000).
- [3] Barnadas R. y Sabés M. "Liposomes prepared by high-pressure homogenizers". Methods in enzymology, Vol.367:28-46 (2003).
- [4] García M., Flowers C., Cook J. "The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability". J. Nutr. 126:251-258 (1996).
- [5] Glahn R., Gangloff M.B., van Campen D.R., Miller D.D., Wien E.M., Norvell W.A. "Bathophenanthroline disulfonic acid and sodium dithionite effectively remove surface-bound iron from Caco-2 cell monolayers." J. Nutr. 125:1833-1840 (1995).

Para mayor información contactarse con:  
Laura Hermida - [lhermida@inti.gov.ar](mailto:lhermida@inti.gov.ar)