

Evaluación de la Citotoxicidad Inducida por TiO₂ modificado Funcionalizado con Folato y Oro sobre Líneas Celulares de HeLa y CHO

Mónica J. Basante-Romo⁽¹⁾, Oscar Gutierrez⁽²⁾ y Rubén J. Camargo-Amado⁽¹⁾

(1) Grupo de investigación Fisicoquímica de Bio y Nanomateriales, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Calle 13 No 100-00, A. A. 25360, Cali-Colombia (e-mail: monica.basante@correounivalle.edu.co; ruben.camargo@correounivalle.edu.co)

(2) Grupo de investigación Farmacología UNIVALLE-In Vitro Facultad de salud, Universidad del Valle. Calle 4B N 36-00, A. A. 25360, Cali-Colombia (e-mail: ogutmon@yahoo.com)

Recibido Abr. 13, 2016; Aceptado May. 20, 2016; Versión final Jul. 18, 2016, Publicado Oct. 2016

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la determinación del efecto fotocatalítico de los nanocompuestos TiO₂mod-AF y TiO₂mod-AF-Au en línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa y línea celular normal CHO. El óxido de titanio (TiO₂), una sustancia con posibles y futuros usos en los tratamientos de diferentes tipos de cáncer, es analizado por su posible citotoxicidad al estar expuesto a la luz ultravioleta. Se determinó el porcentaje de citotoxicidad de los nanomateriales en presencia y ausencia de luz ultravioleta mediante el kit de detección de citotoxicidad. Los resultados mostraron que los nanomateriales bajo los parámetros establecidos son tóxicos en células HeLa, y no tóxicos en células CHO. El mayor porcentaje de citotoxicidad en células HeLa fue 78% que corresponde al efecto del nanomaterial TiO₂mod-AF-Au expuesto a 40 min de radiación ultravioleta. Estos resultados de selectividad hacia células cancerígenas abren una posible vía para el tratamiento del cáncer con menos efectos secundarios sobre la salud humana.

Palabras clave: dióxido de titanio; ácido fólico; oro; células HeLa

Evaluation of Cytotoxicity induced by Modified TiO₂ Functionalized with Folate and Gold on Hela and CHO Line Cells

Abstract

The main objective of this work was to determine the photocatalytic effect of the TiO₂mod-FA and TiO₂mod-FA-Au nanomaterials on Hela and CHO line cells. Titanium oxide (TiO₂), a substance with possible and future use on the treatment of different cancer types, is analyzed due to its possible cytotoxicity effects when it is exposed to ultraviolet light. The level of cytotoxicity of the nanomaterials in presence and absence of ultraviolet light was determined by the cytotoxicity detection kit. The results showed that the nanomaterials under the established parameters are toxic on Hela cells but non-toxic on CHO cells. The effect of the TiO₂mod-FA-Au nanomaterials exposed over 40 minutes to ultraviolet light showed 78% of cytotoxicity on Hela cells, being the highest percentage between the nanomaterials. The selectivity over cancer cells was the main finding that could become a possible path for cancer treatment with lower secondary effects on human health.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles; folic acid; gold; HeLa cells

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, encabeza la lista de causas de mortalidad más frecuentes. Los métodos más comunes para el tratamiento del cáncer como lo son la quimioterapia, radioterapia, la cirugía o la combinación de los métodos. Aunque son efectivos, pueden ser perjudiciales en algunos pacientes a causa de fuertes efectos secundarios como daño en células sanas y alteraciones de las mismas, con el tiempo, debido a la permanencia de las sustancias químicas en el cuerpo y a la acción radioactiva (Lange et al., 2011).

Las propiedades físico químicas del dióxido de titanio (TiO₂) logran que se use en procesos fotocatalíticos (Chen et al., 2015). Bajo radiación ultravioleta las partículas de TiO₂ pueden generar radicales libres OH[•] y O₂⁻, por ello es altamente usado para descomposición de materia orgánica, desinfección y muerte de virus, bacterias, hongos y ahora células de cáncer (Lai y Lee, 2009). La fototerapia de células malignas, utilizando el TiO₂, ha sido reconocido como un potencial agente fotosensibilizador de la terapia fotodinámica debido a su efecto foto-tóxico y la reducción de las partículas de TiO₂ tamaño nanométrico podría llegar a aumentar la eficiencia fotocatalizadora.

El ácido fólico (AF) es usado como fármaco que se dirige hacia las células cancerígenas por el receptor de folato que las células cancerígenas humanas expresan. Una vez el AF se pone en contacto con el receptor de AF es internalizado mediante endocitosis. El ácido fólico ha sido conjugado con nanopartículas de polímeros (Sulistio et al., 2011), o incorporado en dendrímeros con el fin de lograr selectividad sobre células cancerígenas. Además, nanopartículas de oro dopadas con AF han sido usadas para detección y muerte de células cancerígenas (Zhang et al., 2011). Los estudios realizados en este trabajo tienen como objetivo determinar el efecto fotocatalítico para degradar líneas celulares cancerígenas de cuello uterino HeLa con la aplicación del nanocompuesto, dióxido de titanio dopado con ácido fólico y oro (TiO₂ modi-AF-Au).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la citotoxicidad del nanomaterial TiO₂ modificado funcionalizado con folato y oro en presencia de radiación UV, variando el tiempo de exposición a la radiación y la concentración sobre dos líneas celulares una de cáncer HeLa y otra normal CHO, se planificó un desarrollo metodológico en el cual primero se sintetizó el nanomaterial para luego caracterizarlo. Las células HeLa 229 y CHO-K1 fueron expuestas a la presencia del nanomaterial y de la luz UV simultáneamente. Finalmente, se evaluó la citotoxicidad mediante la técnica de detección de citotoxicidad (LDH de Roche).

Síntesis del nanomaterial TiO₂

Los nanocompuestos fueron sintetizados por el proceso sol-gel (Rodríguez-Páez et al., 2011). El proceso sol-gel se divide en las siguientes etapas: la primera, es la formación del sol que se da en los primeros minutos de la reacción; a temperatura ambiente y bajo agitación moderada, se solubiliza Tetrabutoxido de Titanio (TBT), Ti(OBu)₄ en alcohol etílico anhidro, posteriormente se adiciona agua destilada y desionizada. Luego, comienza la etapa de gelación que ocurre durante los siguientes 3 días. Posteriormente, se llevó a un proceso de secado a 100°C y a 200 °C. La etapa final es la calcinación de los compuestos a una temperatura de 500 °C.

Síntesis del nanomaterial TiO₂ modificado

La modificación de TiO₂ consiste en la formación de varios grupos funcionales durante el proceso de síntesis. La síntesis de este nanomaterial fue desarrollada en los laboratorios del grupo de investigación Físico-Química de Bio y Nanomateriales de la Universidad del Valle (Colombia) (Camargo-Amado et al., 2016).

Síntesis del nanomaterial TiO₂ mod-AF

A temperatura ambiente y bajo agitación en un equipo de ultrasonido, se solubiliza durante 5 minutos 30 ml Diciclohexil carbodimida (DCC) (Aldrich) y N-hidroxisuccinimida (NHS)(Aldrich) en una relación 1:1 con una concentración 0.05 mol/L en DMSO (Setua et al., 2010; Zhang et al., 2010). Luego, se adiciona 1.5 g de TiO₂ modificado (previamente sintetizado), y se agita por 1 hora en ultrasonido. Luego se adiciona 0.03g de Ácido fólico (FA) (Fisher) y se agita por 45 minutos en ultrasonido y luego en una plancha de agitación durante 6 horas. Posteriormente, se centrifuga y se seca por 1 hora a 100 °C.

Síntesis del nanomaterial TiO₂ mod-AF-Au

Para la síntesis de TiO₂ mod-AF-Au se debe tener TiO₂ mod-AF previamente sintetizado y sobre el cual se deposita oro por pulverización catódica. A 0.5 g de TiO₂ modificado en polvo se le expuso a vapor de oro

generado por la acción de plasma de argón con un blanco de oro, el procedimiento se llevó a cabo durante 6 minutos dentro de un equipo Denton Vacuum Sputter Coater, a 200 miliTorr de vacío y con una corriente de 30 mA (Camargo-Amado., 2012).

Caracterización de nanomateriales

Los nanocompuestos fueron caracterizados mediante espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (IR) usando bromuro de potasio (KBr) y difracción de rayos X (DRX).

Estudio fotocatalítico

Las líneas celulares Hela 229 (ATCC CCL-2.1) y CHO- K1 (ATCC CCL-61) se descongelaron según el protocolo de descongelación. Las células Hela 229 se cultivaron en el medio de cultivo DMEM (Gibco) con 10 % de suero fetal bovino, las células CHO-K1 se usaron como control, se cultivaron en el medio de cultivo F-12K (Gibco) con 10% de suero fetal bovino. Se sembró 5×10^4 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos un día antes de la prueba para asegurar su adhesión. Los nanomateriales se dispersaron en el medio DMEM 24 horas antes. Después, las células se expusieron a los nanomateriales por 3h y luego se irradiaron con luz UVA, a dos tiempos (20min y 40 min), dentro de un reactor fotocatalítico con sistema de control de temperatura y de tiempo. El reactor usó ocho lámparas ultravioleta marca en-Lite FT8/potencia de 18W cada una, como fuente de luz UV ubicadas en la parte superior del reactor, las lámparas emiten preferencialmente a los 365 nm.

Se diseñó un experimento usando como variables el tiempo de exposición a la radiación UVA (20 y 40 minutos), la concentración de los nanomateriales (100 y 200 ppm), el tipo de nanomaterial (TiO₂, TiO₂ mod-AF y TiO₂ mod-AF-Au) y el tipo de línea celular (HeLa 229 y CHO-K1) y se determinó el efecto que tiene la presencia de radiación UV y los nanomateriales sobre las líneas celulares. Cada ensayo tuvo 4 réplicas y controles siguiendo el protocolo de detección de citotoxicidad (Roche), una alternativa colorimétrica, precisa y simple basada en medir la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en células con daño (Smith et al., 2011; Vijayakumar y Ganesan, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan y discuten en cuatro subsecciones: Análisis IR con transformada de Fourier, Análisis DRX, Citotoxicidad en células HeLa, y Citotoxicidad en células CHO

Análisis IR con transformada de Fourier

En la Fig.1 Se observa el espectro de (a) TiO₂ y de (b) AF. Las bandas a 2939 cm⁻¹ y 2838 cm⁻¹ son referentes a los grupos CH₂ y CH (Cunha et al., 2012), la presencia de la banda 3327 cm⁻¹ es referente al grupo N-H (Escócio et al., 2011) , producidos durante la síntesis para obtener TiO₂-mod-AF. Las bandas entre 1680cm⁻¹ y 1725 cm⁻¹ de los espectros de (c)TiO₂-mod-AF y (d)TiO₂-mod-AF-Au evidencian la presencia de AF (Lai y Lee., 2009). Se observa en (a), (c) y (d) el intervalo entre 400 y 1000 cm⁻¹ que es la región donde se encuentran las bandas correspondientes a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C características de fase anatasa (Ochoa et al., 2009).

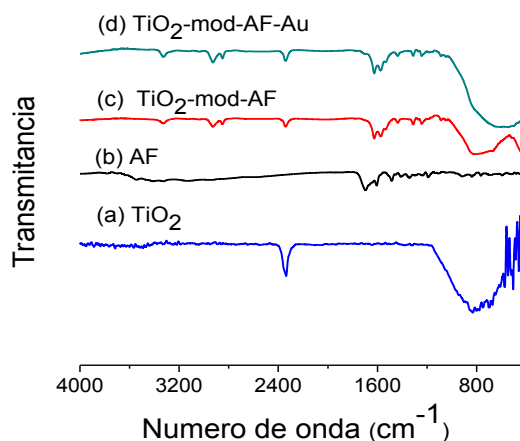


Fig. 1 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier a) TiO₂ b) ácido fólico (AF) c)TiO₂ mod-AF d) TiO₂mod- AF-Au

Análisis DRX

La Fig.2 muestra que el TiO₂ sintetizado corresponde TiO₂ tipo Anatasa pura con código de referencia 01-071-1166, con arreglo tetragonal. La Fig.2 muestra los parámetros de DRX de (b) TiO₂-mod-AF (c) TiO₂-mod-AF-Au comparados con los parámetros de DRX de (a) TiO₂, se observa que los picos característicos de TiO₂ anatasa se encuentran presentes en menor intensidad. En cuanto a la cantidad de Au referencia 01-071-4615 (Calculado con ICSD usando POWD-12++, 2004) en (c) TiO₂-mod-AF-Au se reporta en un porcentaje del 1%. Los patrones de DRX para los nanocompuestos muestran que la estructura de TiO₂ tipo Anatasa no se ve afectada por la presencia de los demás compuestos.

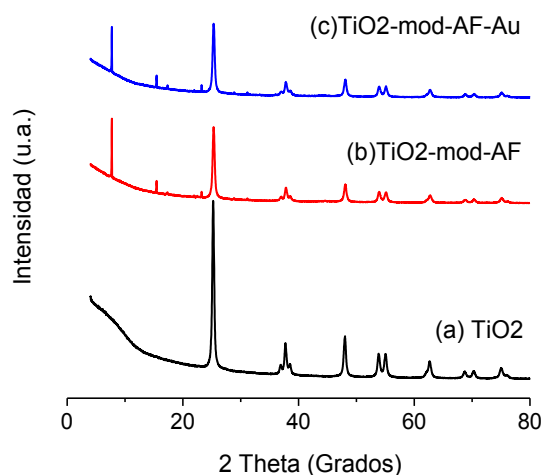


Fig. 2: Difracción de rayos X a) TiO₂ b) TiO₂mod-Fa c) TiO₂mod-FA-Au

Citotoxicidad en células HeLa

La Fig.3 muestra los resultados de citotoxicidad de A= TiO₂, B= TiO₂-mod-AF y C= TiO₂-mod-AF-Au a dos concentraciones 1= 200 ppm y 2= 100ppm sobre líneas celular HeLa.

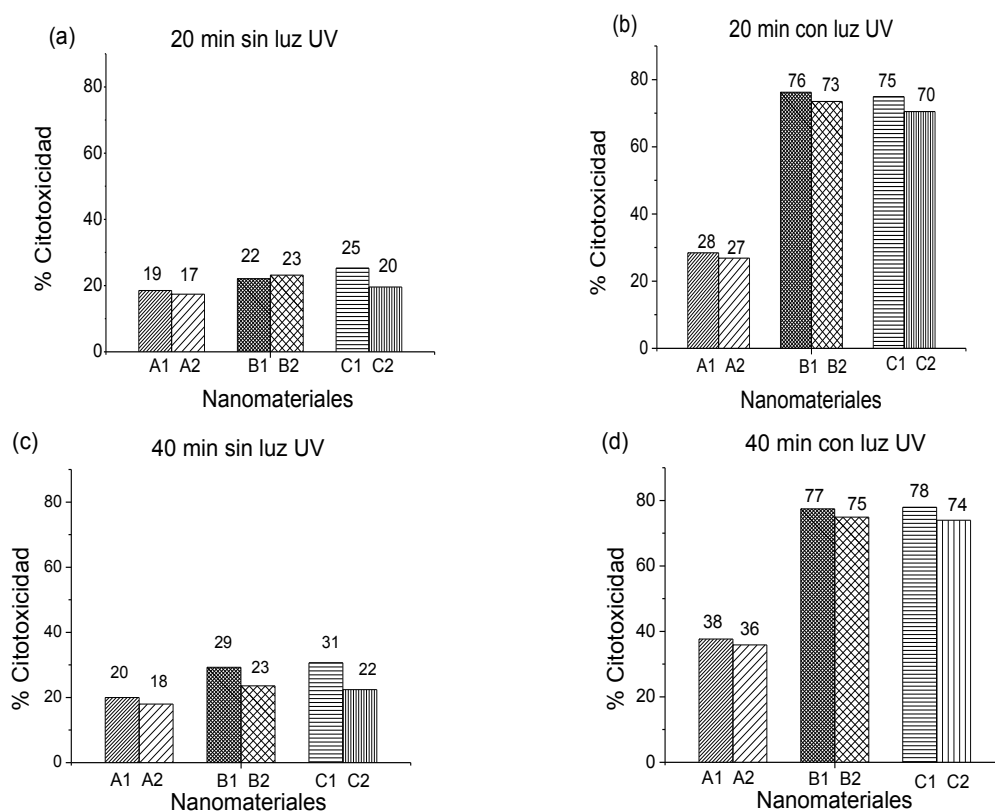


Fig. 3 Citotoxicidad línea celular HeLa (a) 20 min sin exposición a Luz UV, (b) 20 min con exposición a Luz UV (c) 40 min sin exposición a Luz UV (d) 40 min con exposición a Luz UV

Los resultados de la Fig.3(a) y 3(c) muestran el efecto del tiempo de exposición de células HeLa a los nanomateriales en ausencia de luz UV. Se obtuvo un porcentaje mínimo de citotoxicidad del 17% a un tiempo de 20 min con el nanomaterial A2 (TiO₂ en una concentración de 100 ppm), y un máximo de citotoxicidad del 31% en un tiempo de 40 min con el nanomaterial C1 (TiO₂-mod-AF-Au en una concentración de 200 ppm).

Los resultados de la Fig.3(b) y 3(d) muestran el efecto del tiempo de exposición de células HeLa a los nanomateriales en presencia de luz UV. Se obtuvo un porcentaje mínimo de citotoxicidad del 27% con el nanomaterial A2 (TiO₂ a 100ppm) y un máximo de citotoxicidad de 78% en un tiempo de 40 min de exposición con el nanomaterial C1(TiO₂-mod-AF-Au a 200 ppm). Al comparar los porcentaje de citotoxicidad entre los nanomateriales se observa que los nanomateriales B y C presentan mayor porcentaje que A, demostrando que las modificaciones durante la síntesis del nanomaterial causan un efecto significativo y positivo sobre la citotoxicidad de las células cancerígenas HeLa.

Citotoxicidad en células CHO

La Fig.4 muestra los resultados de citotoxicidad de A= TiO₂, B= TiO₂-mod-AF y C= TiO₂-mod-AF-Au a dos concentraciones 1= 200 ppm y 2= 100ppm sobre líneas celular CHO.

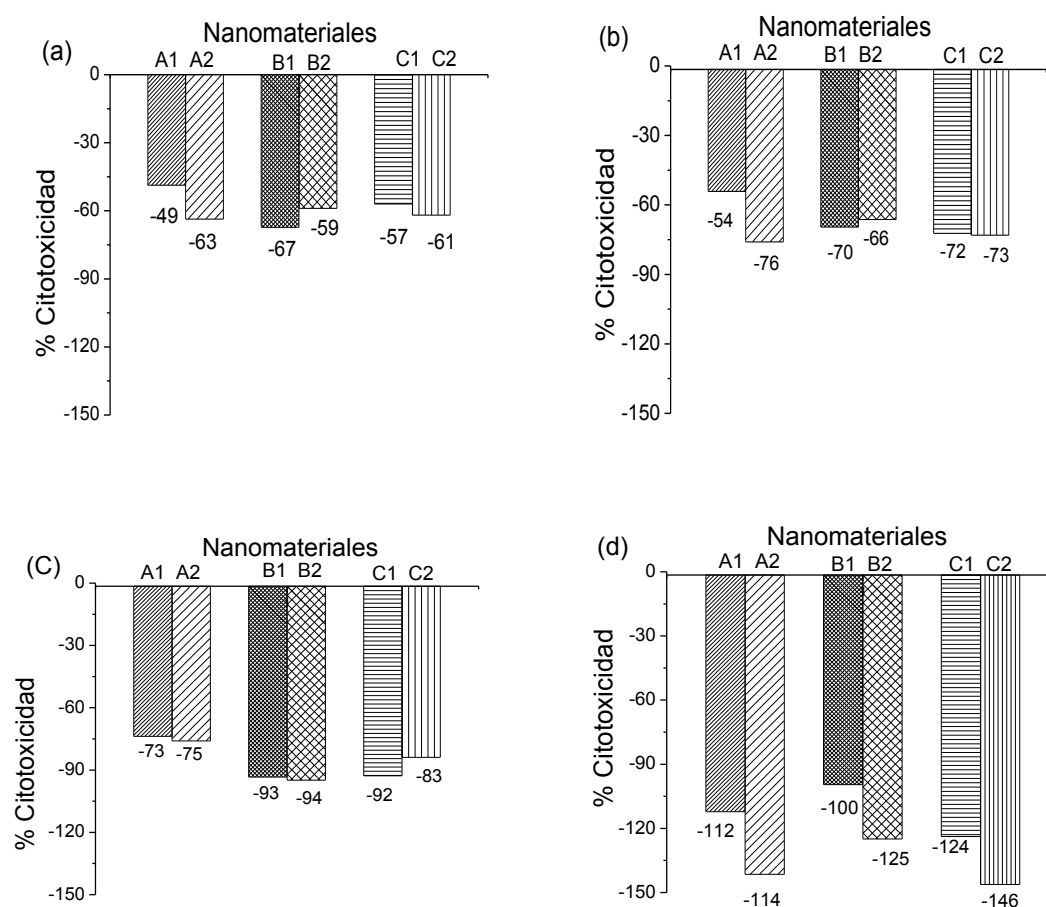


Fig. 4 Línea celular CHO (a) 20 min sin exposición a Luz UV, (b) 20 min con exposición a Luz UV (c) 40 min sin exposición a Luz UV (d) 40 min con exposición a Luz UV

Los resultados de citotoxicidad de los nanomateriales en células normales CHO son negativos, demostrando que no hay efecto citotóxico de ninguno de los nanomateriales usados en la presente investigación, esto a una concentración menor de 200ppm. De igual forma muestran que el efecto de la luz UV no genera efecto citotóxico en un tiempo menor a 40 min.

CONCLUSIONES

De los resultados mostrados, de su análisis y su discusión, se pueden obtener las siguientes conclusiones: (1) Se logró sintetizar un material selectivo que afecta a células de cáncer HeLa y no daña a células CHO, que sólo se logra una dosis letal 50 en las condiciones en los que se combina la sustancia y la radiación

ultravioleta. Se tiene una potencial vía para el tratamiento del cáncer con posiblemente menos efectos secundarios sobre la salud humana; y (2) La presencia de AF y Au en el nanomaterial TiO₂-mod-AF-Au incrementa el efecto fotocatalítico del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS y a la Universidad del Valle en Colombia.

REFERENCIAS

Camargo-Amado, R. J. "Efecto Fotocatalítico Del TiO₂-Au Sobre Células de Cáncer de Cuello Uterino. ingeniería y competitividad, 14 (2), 191–98 (2012)

Camargo-Amado, R. J., O. Gutierrez, M. Basante-Romo, W. Criollo. Síntesis de nanocompuestos que incorporan dióxido de titanio (TiO₂) fase anatasa y composiciones que los contienen", Colombia, A61P 35/00. 27 de Junio (2016)

Chen, X., L. Liu, F. Huang. "Black Titanium Dioxide (TiO₂) Nanomaterials." Chemical Society Reviews, 44 (7), 1861–85 (2015)

Cunha, T., H. O. Stumpf, C. L. M. Pereira, H. S. Pires, L. F. C. de Oliveira, E. F. Pedroso, W. C. Nunes. "Síntese, Caracterização E Estudo Das Propriedades Magnéticas de Um Polímero de Coordenação Contendo cobalto(II) E cobre(II)." Química Nova, 35 (9), 1776–81 (2012)

Escócio, V., L. Visconte, M.B. M. De Carvalho, R. C. R. Nunes, V. Altstädt. Caracterização Térmica E Dinâmico-Mecânica de Compósitos TPU/mica Preparados Em Reômetro de Torque. Polímeros, 21 (3), 240–45 (2011).

Lai, T., W. Lee. Killing of Cancer Cell Line by Photoexcitation of Folic Acid-Modified Titanium Dioxide Nanoparticles. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 204 (2-3): 148–53 (2009)

Lange, S. S, K. Takata, R. D Wood. "DNA Polymerases and Cancer." Nature Reviews, Cancer 11 (2): 96–110 (2011)

Ochoa Y., Y. Ortegón, M. Vargas, J. E. Rodríguez. síntesis de tio₂, fase anatasa, por el método pechini. Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, S1 (3): 931-937 (2009)

Rodríguez-Páez, J., M. Vargas-Urbano, P. Mosquera, R. Camargo-Amado, Y. Ortegón-Fernández, Y. Ochoa-Muñoz. Nanopartículas de Tio₂, Fase Anatasa, Sintetizadas Por Métodos Químicos. Ingeniería Y Desarrollo 29: 186–201 (2011)

Setua, S., D. Menon, A. Asok, S. Nair, M. Koyakutty. Folate Receptor Targeted, Rare-Earth Oxide Nanocrystals for Bi-Modal Fluorescence and Magnetic Imaging of Cancer Cells. Biomaterials 31 (4) 714-29 (2010)

Smith, S. M., M. B. Wunder, D. A. Norris, Y. G. Shellman. A simple protocol for using a LDH-Based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. PLoS ONE, 6(11), (2011)

Sulistio, A., J. Lowenthal, A. Blencowe, M. N. Bongiovanni, L. Ong, S. L. Gras, X. Zhang, G. G. Qiao. Folic Acid Conjugated Amino Acid-Based Star Polymers for Active Targeting of Cancer Cells. Biomacromolecules 12 (10): 3469–77 (2011)

Vijayakumar S., Ganesan S. In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. Journal of Nanomaterials 2012, (2012)

Zhang, Z., J. Jia, Y. Lai, Y. Ma, J. Weng, L. Sun. "Conjugating Folic Acid to Gold Nanoparticles through Glutathione for Targeting and Detecting Cancer Cells." Bioorganic and Medicinal Chemistry 18 (15): 5528–34 (2010)

Zhang, Z., J. Jia, Y. Ma, J. Weng, Y. Sun, L. Sun. "Microwave-Assisted One-Step Rapid Synthesis of Folic Acid Modified Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Detection." MedChemComm 2 (11): 1079 (2011)