

Láminas de vidrio recubiertas con TiO_2 -m y su efecto citotóxico sobre células leucémicas Molt4

Glass Sheets Coated with TiO_2 -m and its Cytotoxic Effect on Leukemic Cells Molt4

Jaime A. Garcia-Diosa¹ y Rubén J. Camargo-Amado¹

Resumen

La terapia fotodinámica (PDT) se ha convertido en una alternativa importante para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, debido a sus grandes ventajas frente a métodos convencionales. En este campo, las nanopartículas de TiO_2 son uno de los fotosensibilizadores más ampliamente estudiados, por su alta actividad fotocatalítica, alta absorción de radiación UVA y alta biocompatibilidad. Aunque hay varios estudios satisfactorios relacionados con el tratamiento PDT, usando nanopartículas de TiO_2 , para diferentes tipos de células cancerosas adherentes, existen muy pocos reportes de esta metodología aplicada para células no adherentes, debido a los retos relacionados con el volumen de tratamiento y el alcance de la radiación. Para afrontar este reto, nanopartículas de TiO_2 modificadas (TiO_2 -m) se depositaron sobre sustratos de vidrio para estudiar el efecto citotóxico de PDT sobre células Molt4, células no adherentes, usando estos recubrimientos. Se comprobó la formación de recubrimientos uniformes sobre los sustratos mediante la desviación estándar de la transmitancia en el rango UVA, en diferentes puntos. Se realizaron diferentes pruebas experimentales de PDT de células Molt4 sobre recubrimientos de TiO_2 -m y el efecto citotóxico de los tratamientos fue evaluado por medio de concentración LDH. Los resultados demostraron la posibilidad de generar un efecto citotóxico de células cancerosas no adherentes con solo 20 min de contacto y 40 min de radiación UVA. Este resultado es el primer avance para el posible desarrollo de nuevas metodologías en la aplicación de PDT en células no adherentes usando recubrimientos de TiO_2 -m.

Palabras clave: terapia fotodinámica, dióxido de titanio, leucemia, cáncer, recubrimiento nanoestructurado

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has become an important alternative for the treatment of different types of cancer, due to its great advantages over conventional methods. In this field, TiO_2 nanoparticles are one of the most widely studied photosensitizers due to their high photocatalytic activity, high absorption of UVA light and high biocompatibility. Although there are several successful studies related to PDT treatment, using TiO_2 nanoparticles, for different types of adherent cancer cells, there are few reports of PDT applied to non-adherent cancer cells, due to the challenges related to blood volume and light penetration. To address this challenge, modified TiO_2 nanoparticles (TiO_2 -m) were deposited on glass substrates to study the cytotoxic effect of PDT on Molt4, non-adherent cells, using these coatings. The shaping of uniformed coatings on substrates was proved by standard deviation of transmittance in the UVA range at different points. Different experimental PDT tests of Molt4 cells on TiO_2 -m coatings were performed and the treatment cytotoxic effect was evaluated by LDH concentration. The results demonstrated the possibility of generating cytotoxic effect on non-adherent cancer cells with only 20 min of contact and 40 min of UVA radiation. This result is the first step for the possible development of new methodologies in the application of PDT on non-adherent cells using TiO_2 -m coatings

Keywords: photodynamic therapy, titanium dioxide, leukemia, cancer, nanostructured coating

Recepción: 07-ago-2020

Aceptación: 11-dic-2020

¹Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Universidad del Valle, Cali, Colombia. Autor de correspondencia: ruben.camargo@correounivalle.edu.co

1 Introducción

La terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés) consiste en irradiar, a una longitud de onda apropiada, sobre un tejido previamente fotosensibilizado mediante un compuesto químico, el cual produce muerte celular debido a la gran cantidad de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que se producen con su activación [1]. La PDT se rige por la oxidación mediante procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios en la estructura química de diversas sustancias, que involucra la generación de especies transitorias como radicales hidroxilos, estas especies poseen propiedades adecuadas para atacar casi a todos los compuestos orgánicos [2].

El uso del PDT para el tratamiento de células cancerosas tiene varias ventajas, algunas de las más sobresalientes son, no tiene el riesgo de esparcir células cancerosas en los tejidos adyacentes, no genera resistencia al tratamiento ni toxicidad por acumulación de fármaco [3, 4]. Existen diversos materiales con propiedades idóneas para ser usados como agentes fotosensibilizadores y llevar a cabo reacciones fotocatalíticas, entre ellos las nanopartículas de TiO_2 en fase anatasa han sido ampliamente estudiadas en aplicaciones biológicas debido sus características privilegiadas: alta estabilidad química, alta actividad fotocatalítica con ancho de banda de 3.2 eV, alta biocompatibilidad y baja toxicidad [5-7]. El uso de nanopartículas de TiO_2 para el tratamiento PDT de diferentes tipos de cáncer ha sido reportado como satisfactorio por diferentes investigadores [8-10].

Previamente, se ha desarrollado diferentes tipos de nanopartículas de TiO_2 con características especiales para el tratamiento de células cancerosas, estas nanopartículas fueron sintetizadas con modificaciones en la metodología de síntesis sol-gel, este grupo de nanopartículas se denominan dióxido de titanio modificado ($\text{TiO}_2\text{-m}$) [11]. Este tipo de nanomaterial se caracteriza por permitir realizar PDT a células cancerosas de manera selectiva, se ha reportado el uso de nanopartículas de $\text{TiO}_2\text{-m}$ en el PDT selectivo de células cancerosas de cuello uterino (células HeLa), las cuales demostraron una citotoxicidad mayor al 70% de células HeLa mediante la

activación con radiación UVA, y no generar citotoxicidad apreciable en células CHO [11, 12].

En el caso particular del tratamiento PDT para la leucemia, usando nanopartículas de TiO_2 , existen pocos estudios reportados en la literatura, debido a que las células leucémicas provenientes de sangre periférica son células no adherentes, que tienen sus propios desafíos al momento de implementar PDT en una fase clínica o en estudios avanzados *in vivo*. Estos desafíos están relacionados principalmente con la manera de activar el TiO_2 en los tejidos profundos y el enorme volumen que representa la sangre periférica [13]. Adicionalmente el uso de nanopartículas suspendidas para el tratamiento de células leucémicas de sangre periférica sería poco práctico, debido a que se tiene que irradiar con luz UVA todo el torrente sanguíneo.

Para abordar estos desafíos relacionados con la aplicación de PDT a células cancerosas no adherentes, proponemos el desarrollo de métodos para la elaboración de recubrimientos de nanopartículas sobre sustratos, transparentes a la radiación UVA, con el propósito que las células no adherentes entren en contacto con el componente fotosensibilizador soportado en el recubrimiento, y se pueda generar un efecto citotóxico. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto citotóxico que el recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$ /vidrio tiene sobre células leucémicas Molt4. Este es el primer estudio relacionado con tratamiento fotodinámico de células cancerosas no adherentes usando sustratos recubrimientos de $\text{TiO}_2\text{-m}$.

2 Metodología

2.1 Materiales y reactivos

Las láminas de vidrio, usadas en la presente investigación como sustratos, fueron obtenidas del fabricante Labware Manufacturing Co.–Marca Citotest. El lavado de los sustratos se realizó usando ácido nítrico (Merk, grado analítico), acetona (Merk, grado analítico) y etanol (Sigma Aldrich, $\geq 95\%$).

El recubrimiento del sustrato se realizó usando una suspensión sol-gel de $\text{TiO}_2\text{-m}$, la cual, se sintetizó a partir de Butóxido de titanio (Sigma

Aldrich, $\geq 97\%$), etanol (Sigma Aldrich, $\geq 95\%$) y agua destilada.

La línea celular de leucémicas conocida como Molt4 (ref CRL-1582), son leucemia linfoblástica aguda humana, fueron adquiridas para esta investigación en American Type Culture Collection (ATCC). Medio RPMI 1640 (Gibco), suero fetal bovino (Gibco) y antibiótico penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL, Gibco) fueron usados en la preparación del medio de cultivo de las células leucémicas.

La citotoxicidad del tratamiento fotodinámico sobre Molt4 se determinó con la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH), usando el kit Citotoxicity Detection Plus LDH (Roche), y lector de ELISA (Bio-Rad – iMark).

2.2 Recubrimiento de láminas de vidrio

Los sustratos de vidrio fueron sumergidas en 3 soluciones diferentes durante 10 min cada una, usando el baño de ultrasonido Transsonic-TS540, con el propósito de limpiar y remover impurezas de la superficie. Las soluciones de limpieza fueron ácido nítrico, acetona y etanol, con lavados intermedios de agua destilada entre cada solución. Las láminas limpias fueron secadas en horno de convección a 90 °C durante 120 minutos. Posteriormente, la superficie de los sustratos fue tratada con plasma de aire atmosférico por medio del tratador corona de una extrusora de polímero (2KVA - Indelec Ltda.) a 0.3 A, 15 kV y velocidad de banda 1.0 metros por minuto.

Las láminas de sustratos limpias y tratadas con plasma de aire fueron recubiertas por metodología *dip-coating*, usando los soles provenientes de la suspensión sol-gel de TiO₂-m. Se realizaron 5 capas de recubrimiento con velocidad de inmersión de 180 mm/min y secados intermedios de 60 °C por 30 minutos, entre cada capa de recubrimiento. Finalmente, los sustratos recubiertos con TiO₂-m fueron tratados térmicamente hasta una temperatura de 600 °C por 4 horas. La suspensión sol-gel de TiO₂-m fue preparada como se describió previamente [11].

2.3 Uniformidad del recubrimiento

La uniformidad del recubrimiento de TiO₂-m sobre los sustratos se determinó como una medida de la desviación estándar de la transmitancia (%T) UVA en cinco puntos diferentes del sustrato recubierto, usando parte de la metodología descrita por M. Rismanchian y colaboradores [14]. Las medidas de transmitancia se realizaron en un espectrofotómetro con esfera de integración, Evolution 600–Thermo Scientific, a una longitud de onda de 365 nm, en la cual, se activa el TiO₂-m [15]. Según la metodología empleada, entre menor sea el valor de la desviación estándar de los datos obtenidos, menor será la varianza del %T en el recubrimiento y, por lo tanto, una mayor uniformidad.

2.4 Tratamiento Fotodinámico

Para realizar las pruebas fotodinámicas, se preparó un cultivo celular Molt4 con medio RPMI, suero fetal bobino y antibiótico en proporción 98:1:1, respectivamente. La densidad celular se ajustó a 100,000 células/mL.

Para estudiar la citotoxicidad de los diferentes componentes que pueden afectar a las células Molt4 dentro el sistema, se evaluaron los efectos citotóxicos debido a la radiación UVA, al sustrato de vidrio y al recubrimiento de TiO₂-m, de manera independiente. Por lo tanto, se estudiaron los efectos citotóxicos en 4 condiciones experimentales diferentes. Las láminas de referencia, sustratos recubiertos y todos los implementos necesarios para las pruebas fueron esterilizados previamente en autoclave.

En la Figura 1 se muestra un esquema de las diferentes pruebas experimentales con células Molt4 para evaluar la citotoxicidad. Se realizaron 2 pruebas en un cuarto oscuro, es decir sin radiación, por 20 y 40 min, Prueba 1 y 2 respectivamente, y 2 pruebas con tratamiento fotodinámico durante 20 y 40 min, Pruebas 3 y 4 respectivamente. Antes de iniciar cada prueba, las placas tuvieron un tiempo de reposo de 20 min para establecer un contacto entre las células Molt4 y el recubrimiento de TiO₂-m.

Se adicionaron 500 μ L de cultivo Molt4 en pozos con láminas de referencia y sustratos con recubrimiento de TiO₂-m. La siembra se realiza por

triplicado en placas de cuerpo opaco de 24 pozos. Los controles de fondo, alto y bajo también fueron realizados por triplicado en la misma placa.

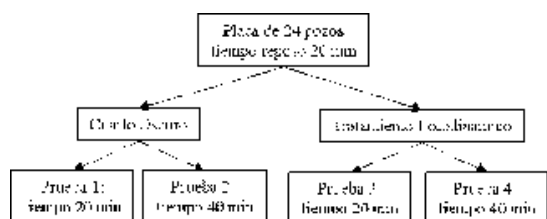


Figura 1. Pruebas experimentales con células Molt4 para evaluar la citotoxicidad.

El efecto citotóxico debido a la radiación UVA se evaluó sembrando Molt4 sin la presencia del sustrato ni recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$. El efecto citotóxico debido al sustrato se evaluó con células Molt4 sobre láminas de referencia, es decir sustrato sin recubrimiento. El efecto citotóxico debido al recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$ se evaluó sembrando células Molt4 sobre sustratos recubiertos.

El tratamiento fotodinámico se realizó en un fotorreactor con lámparas de radiación UVA, el cual consisten en un set de lámparas BlackLight Blue (Philips), que emiten radiación a una longitud de onda de 365 nm, y extractores de calor con control de temperatura para mantener la temperatura constante a 37 °C [16]. Las placas que ingresaron al fotorreactor se organizaron de manera que la fuente de radiación incidiera en la base del sustrato recubierto para activar, de abajo hacia arriba, el $\text{TiO}_2\text{-m}$ de la superficie e iniciar el tratamiento fotodinámico de las células que se encuentran en la superficie. Es importante resaltar que la radiación UVA no llega de manera directa a las células Molt4, antes debe atravesar el sustrato y el recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$.

El cálculo de la citotoxicidad en cada uno de los pozos se realiza por triplicado, tomando 3 alícuotas de 100 μL de cada pozo y siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor Roche para el Kit Citotoxicity Detection Plus LDH, en placas de 96 pozos. La lectura de los resultados se realizó con el lector de ELISA, BioRad – iMark, el cual mide la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 490 nm.

3 Resultados y discusión

3.1 Substrato con recubrimiento $\text{TiO}_2\text{-m}$

En la Figura 2 se muestra el sustrato con recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$. En los recubrimientos obtenidos se observa la formación de una capa blanca sin la presencia de cúmulos o acumulación de partículas sectorizada sobre la superficie, como es usual en la metodología *dip-coating*.

El %T se midió en 5 puntos diferentes de la lámina, obteniendo un %T promedio de 7.98 % y una desviación estándar de 0.84 % entre los datos (desviación relativa = 10.58 %). La baja transmitancia de la luz está relacionada con altos espesores en el recubrimiento, que absorben o dispersan una gran parte de la luz. Adicionalmente, la baja desviación entre los datos implica un recubrimiento uniforme que transmite UVA en diferentes puntos de la lámina de manera semejante [14, 17]. Por lo tanto, se obtienen laminas recubiertas uniformemente a partir de la suspensión sol-gel de $\text{TiO}_2\text{-m}$.



Figura 2. Sustrato de vidrio con recubrimiento $\text{TiO}_2\text{-m}$.

3.2 Citotoxicidad en Molt4

Para comprobar que las células están en contacto con la superficie del recubrimiento de $\text{TiO}_2\text{-m}$, se realizaron observaciones de los pozos sembrados bajo el microscopio durante el tiempo de reposo de cada prueba. En la Figura 3 se muestran las células Molt4 sobre el recubrimiento $\text{TiO}_2\text{-m}$ después de los 20 minutos de reposo. Las células Molt4 se identifican por ser células no adherentes con forma esférica bien definida, confirmando que en todos los pozos las células se encuentran en contacto directo con la superficie del recubrimiento.



Figura 3. Células Molt4 sobre recubrimiento TiO₂-m.

En la Figura 4A se observa la posición de la placa en el fotorreactor, de manera que la radiación UVA se transmite a través del sustrato para activar el TiO₂-m, el cual está en contacto directo con las células Molt4 (Figura 4B).

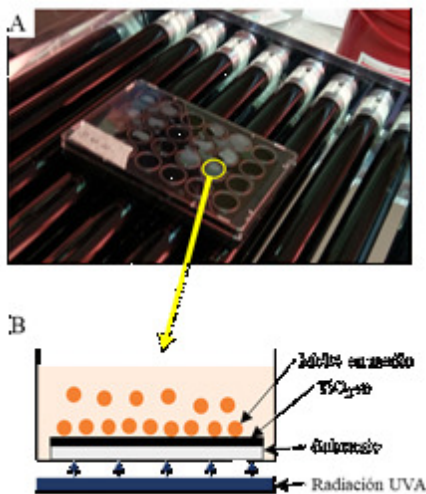


Figura 4. Tratamiento fotodinámico. A) posición de la placa en el fotorreactor. B) Ilustración de la orientación de la fuente de radiación.

Finalizada cada una de las pruebas experimentales de la Figura 1, se mide la citotoxicidad en cada una de las placas. En la Figura 5 se muestra el % citotoxicidad en Molt4 de los diferentes efectos estudiados. El efecto citotóxico debido a la radiación UVA y la lámina de referencia es bajo para todas las pruebas, al igual que las células expuestas al recubrimiento TiO₂-m sin activarse (Prueba 1 y 2). Por otro lado, se obtuvo el mayor valor de citotoxicidad en las células que están en contacto con el recubrimiento de TiO₂-m activado por UVA

durante 40 min (Prueba 4), mientras que, para un tratamiento fotodinámico de 20 min el TiO₂-m no presenta un efecto citotóxico apreciable (Prueba 3). Con esto se comprueba que el TiO₂-m necesita un tiempo mínimo de radiación UVA para provocar muerte celular en las células cancerosas, tal y como se ha reportado en investigaciones previas sobre el tratamiento fotodinámico de células de cáncer de cuello uterino con nanopartículas de TiO₂-m.[11, 12,16]

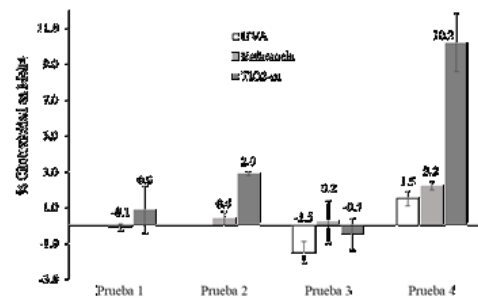


Figura 5. Citotoxicidad en Molt4.

En investigaciones previas se emplearon nanopartículas de TiO₂-m en suspensión para el tratamiento de células cancerosas adherentes, particularmente para el tratamiento fotodinámico de células HeLa durante 40 min de radiación UVA se obtuvieron valores de citotoxicidad por encima del 70%, usando suspensiones de 200 ppm y 3 horas de contacto previo (tiempo de reposo) [12].

Si comparamos el efecto citotóxico del TiO₂-m soportado obtenido en nuestra investigación, % Citotoxicidad = 10.2 %, contra las nanopartículas de TiO₂-m en suspensión, se debe tener en cuenta los siguientes factores: i) el recubrimiento tiene un área superficial, de contacto entre TiO₂-m y la célula, drásticamente menor que las nanopartículas suspendidas en el medio, debido a que el sistema de células y el nanomaterial suspendidos tiene una interacción en 3 dimensiones, mientras que, para láminas de vidrio recubiertas con TiO₂-m es de 2 dimensiones; ii) para los sustratos recubiertos se utilizó un tiempo de reposo o de contacto con las células de 20 min, previo al tratamiento fotodinámico, mientras que para las nanopartículas suspendidas se usó 180 min; iii) durante este tiempo de reposo se permite el ingreso de nanopartículas

al interior del citoplasma por endocitosis, las cuales activan mecanismos de apoptosis durante el tratamiento fotodinámico [15]: iv) las células cancerosas HeLa son adherentes y se adhieren a la superficie y mientras que las células Molt4 no son adherentes y su tendencia natural es mantenerse en suspensión, solo las células que establecen un contacto con la superficie recubierta con TiO₂-m, posiblemente debido a la activación de receptores de membrana, tiene la posibilidad de ser tratadas y oxidadas con los radicales generados por el conjunto TiO₂-m UV, lo que promueve la muerte celular medida como % citotoxicidad.

4 Conclusiones

En el presente trabajo, se elaboraron recubrimientos de TiO₂-m sobre sustratos de vidrio para el PDT de células no adherentes. La baja desviación relativa (10.58%) del %T entre diferentes puntos del recubrimiento demuestra que la transmitancia del sustrato recubierto es similar entre los puntos, comprobando que se obtiene un recubrimiento uniforme.

Durante el PDT de células Molt4, se obtuvo un efecto citotóxico del 10.2% debido a la radiación UVA sobre sustrato de vidrio recubrimientos con TiO₂-m, con solo 20 min de contacto (tiempo de reposo) y 40 min de tratamiento. Adicionalmente, se comprueba que es necesario un tiempo de tratamiento mayor a 20 min para generar muerte celular en células no adherentes.

Este resultado representa un primer avance en el uso de PDT para células cancerosas no adherentes, por medio de recubrimientos de TiO₂-m. abriendo la posibilidad de emplear estos recubrimientos para el desarrollo de nuevas metodologías para el tratamiento de células cancerosas no adherentes. Sin embargo, es necesario continuar estudiando la interacción que se presenta en la interfase membrana celular - TiO₂-m y en la caracterización avanzada de los recubrimientos, para descubrir las variables y fenómenos que puedan favorecer un mayor efecto citotóxico, con el propósito de avanzar en una nueva metodología de PDT de células no adherentes.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias por el apoyo financiero y a la Universidad del Valle.

Referencias

- [1] M. D. Lucroy. "Photodynamic therapy for companion animals with cancer", *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, Vol. 32, p. 693-702, 2002
- [2] R. Daghrrir, P. Drogui, D. Robert, "Modified TiO₂ For Environmental Photocatalytic Applications: A Review", *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 52, p. 3581-3599, 2013.
- [3] D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer", *Nat. Rev. Cancer*, Vol. 3, p. 380-387, 2003
- [4] A. P. Castano, P. Mroz, M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity", *Nat. Rev. Cancer*, Vol. 6, p. 535-545, 2006.
- [5] S. M. Gupta, M. Tripathi, "A review of TiO₂ nanoparticles", *Phys. Chemistry*, Vol. 56, p. 1639-1657, 2011.
- [6] J. Rashid, M. A. Barakat, Y. Ruzmanova, A. Chianese, "Fe₃O₄/SiO₂/TiO₂ nanoparticles for photocatalytic degradation of 2-chlorophenol in simulated wastewater", *Environ Sci Pollut Res*, Vol. 22, p. 3149-3157, 2015.
- [7] K. Hashimoto, H. Irie, A. Fujishima, "TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 44, p. 8269-8285, 2005.
- [8] D. G. You, V.G. Deepagan, W. Um, S. Jeon, S. Son, H. Chang, et al, "ROS-generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer", *Sci. Rep.*, Vol. 6, p. 1-12, 2016.
- [9] J. Bogdan, J. Pławińska-Czarnak, J. Zarzyńska, "Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review", *Nanoscale Res. Lett.*, Vol. 12, p. 225, 2017.

- [10] S. Çeşmeli, C. Biray Avci, "Application of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in cancer therapies", *J. Drug. Target.*, Vol. 27, p. 762-766, 2019.
- [11] R. J. Camargo Amado, J. O. Gutiérrez Montes, M. J. Basante Romo, W. D. Criollo Gómez, "Synthesis of nanocompounds comprising anatase-phase titanium oxide and compositions containing same for the treatment of cancer", US10603381B2, 2015.
- [12] M. J. Basante-Romo, O. Gutierrez, R. J. Camargo-Amado, "Evaluación de la Citotoxicidad Inducida por TiO₂ modificado Funcionalizado con Folato y Oro sobre Líneas Celulares de HeLa y CHO", *Inf. Tecnológica*, Vol. 27, p. 63-68, 2016.
- [13] T. Rajh, N. M. Dimitrijevic, M. Bissonnette, T. Koritarov, V. Konda, "Titanium dioxide in the service of the biomedical revolution", *Chem. Rev.*, Vol. 114, p.10177-10216, 2014.
- [14] M. Rismanchian, F. Golbabaei, Y. Mortazavi, G. Pourtaghi, A. Rahimi Foroushani, P. Nassiri, "A Comparative Evaluation of TiO₂ Suspension Coating Techniques: A Novel Technique to Achieve Optimal Thickness and Uniformity of Photocatalytic Film", *Int. J. Photoenergy*, p. 1-9, 2012.
- [15] [M. Basante, "Mecanismo de acción de Terapia Fotodinámica para cáncer con TiO₂-modificado en células HeLa y sus efectos en modelo animal", Escuela de Ingeniería Química. Universidad del Valle, 2017.
- [16] R. Camargo, "Efecto fotocatalítico del TiO₂-Au sobre células de cáncer de cuello uterino", *Ing. y Compet.*, Vol. 14, p. 191-8, 2012.
- [17] J. Yu, X. Zhao, Q. Zhao, "Effect of surface structure on photocatalytic activity of TiO₂ thin films prepared by sol-gel method", *Thin. Solid Films.*, vol. 379, p. 7-14, 2000.