

ENSAYOS DE TOXICIDAD CELULAR CON NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS CON ACIDO POLISULFÓNICO M-AMINOBENCENO

Cytotoxicity essays with carbon nanotubes functionalized with poly(m-aminobenzene sulfonic acid)

RESUMEN

En este trabajo se investigan los efectos citotóxicos *in vitro* de nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados con *ácido polisulfónico m-aminobenceno* cuando son sometidos a radiación láser en longitud de onda de ventana de agua. El efecto citotóxico *in Vitro* se determina por medio de ensayos de viabilidad celular con el método *MTT* con líneas celulares tumorales 1595 y *colo-255*.

PALABRAS CLAVES: Citotoxicidad, nanotecnología, nanotubos de carbono, nanofototerapia.

ABSTRACT

In this work are investigated the in vitro cytotoxic effects with and without laser radiation of the water soluble composed: single wall carbon nanotubes functionalized with poly(m-aminobenzene sulfonic acid). The cytotoxicity effect in vitro is determined through cell viability test MTT. These test of viability are carried out with two tumoral cellular lines: 1595 and colo-255.

KEYWORDS: Cytotoxicity, carbon nanotubes, nanophototherapy, nanotechnology.

EDGAR GONZÁLEZ

Profesor Investigador
Departamento de Física
Universidad Javeriana
Facultad de Ingeniería Electrónica
Universidad Santo Tomás
nanoCiTec
egonzale@javeriana.edu.co

ELIZABETH GIL

Profesora Investigadora
Departamento de Química
Universidad Javeriana
egil@javeriana.edu.co

CLEMENCIA DE CASTRO

Profesora Investigadora
Facultad de Medicina
Fundación Universitaria San Martín
clemenciade@sanmartin.edu.co

NOHEMÍ TÉLLEZ

Profesora Investigadora
Facultad de Química
Universidad Javeriana
ntellez@javeriana.edu.co

TULIA RIBEROS

Investigadora
Facultad Ciencias
Universidad Javeriana
grupoinfo@gmail.com

FRANCISCO GONZÁLEZ

Estudiante Doctorado
Universidad del Litoral Santa Fé
lfgonzalez@ulsf.edu.ar

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se realizan importantes esfuerzos interdisciplinarios en investigación orientada desde la nanociencia y nanotecnología para el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas con funciones terapéuticas, transporte y suministro de fármacos,

localización y destrucción de células enfermas y sensores ultrasensibles. En el campo de la tecnología basada en nanopartículas y fotónica se han incrementado notablemente los trabajos de investigación motivados por las ventajas que ofrecen estos sistemas desde el punto de vista de alta resolución, imagenología, tratamiento no invasivo y menores costos frente a otras tecnologías. Por

sus notables propiedades eléctricas, mecánicas, térmicas y ópticas, los nanotubos de carbono se proyectan como una importante alternativa como plataforma de soporte y acción terapéutica en medios biológicos, aunque aún no se cuenta con suficiente información sobre el grado de toxicidad y los efectos derivados de la funcionalización, oxidación química y demás tratamientos a los que son sometidos los nanotubos para lograr entre otros resultados, su solubilización o capacidad de reconocimiento molecular, hecho que obliga a incrementar los estudios teóricos y experimentales en esta dirección, específicamente orientados a:

- Desarrollar estrategias que permitan el control de la interacción de los nanotubos de carbono con células vivas.
- Estudiar los efectos citotóxicos de los nanotubos de carbono y condiciones que permitan un uso seguro de estas entidades en ambientes biológicos.

En investigación sobre nanoterapia asistida con nanotubos de carbono ya se han reportado alentadores resultados de la acción térmica sobre células tumorales cuando se someten a radiación infrarroja. Con nanotubos funcionalizados para conseguir su solubilización e identificación del blanco tumoral, se ha conseguido muerte celular selectiva por calentamiento por radiación láser, así como suministro localizado de fármacos [1-3]. Este tipo de resultados ha despertado un creciente interés en el estudio del comportamiento de los nanotubos de carbono en ambientes biológicos, específicamente su grado de toxicidad en términos de la funcionalización y morfología [4].

En este documento se reportan los resultados obtenidos de la investigación sobre efectos tóxicos en células cancerígenas *colo-255* y *seno 1595* con y sin radiación láser del compuesto: nanotubo de carbono de pared simple funcionalizado con el ácido polisulfónico *m-aminobenceno* NTPS-PSAB.

2. MATERIALES Y METODOS

Los nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados usados para la investigación de citotoxicidad fueron adquiridos de la compañía Carbon Solutions Inc. Los NTPS-PSAB presentan longitudes características en el rango de 100-400 nm con diámetros aproximados de 1.5 nm. El método para funcionalización química de los extremos abiertos de los nanotubos de carbono se basa en la amidación de los grupos carboxilos. Con espectroscopía IR se verifica que el polímero se une por vía covalente a los nanotubos por funcionalidad amida (Figura 1). Los NTPS-PSAB presentan una solubilidad en agua de 5 mg/mL y resultan parcialmente solubles en solventes orgánicos tales como la dimethylformamide y anilina. La conductividad es del orden de $5.6 \times 10^{-3} \text{ Scm}^{-1}$ y resulta mayor a la que

presentan los nanotubos de carbono sin funcionalización ($5.4 \times 10^{-7} \text{ Scm}^{-1}$). Estudios con espectroscopia de rayos-X muestran porcentajes atómicos de C 63%, N 7%, O 21%, S 7%, Cl 2%. La absorbancia de los NTPS-PSAB resulta mayor a la que presenta el copolímero PSAB y se hace mayor a la de nanotubos de carbono prístinos a partir de los 14000 cm^{-1} [8].

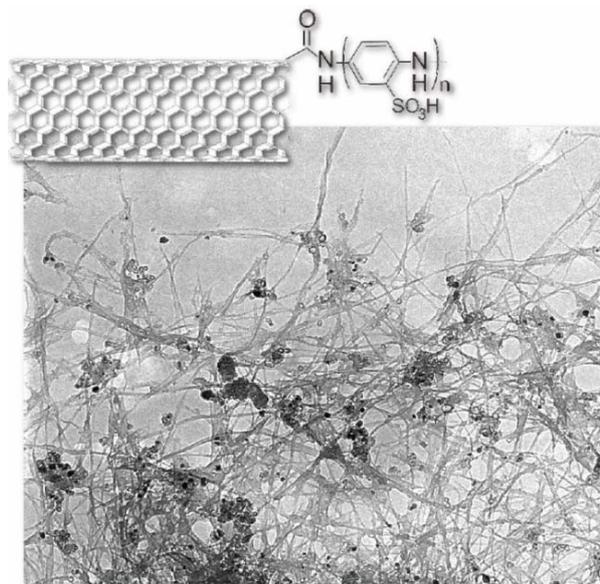


Figura 1. Fotografía con microscopio electrónico de transmisión de nanotubos de carbono con PSAB.

Para la preparación de las muestras biológicas y la realización del estudio experimental de citotoxicidad en función de la concentración, los nanotubos funcionalizados se disuelven en agua y se dispersan con ultrasonido a 20 W (figura 2).



Figura 2. Nanotubos de carbono funcionalizados químicamente con ácido polisulfónico *m-aminobenceno* solubilizados en agua en concentraciones entre 0.62-620 $\mu\text{g/mL}$.

El láser utilizado para radiación de los cultivos celulares fue adquirido en la compañía Intelite, INC, USA con una potencia de salida $< 900 \text{ mW}$ (de mediciones de potencia de salida en función del tiempo se registra una potencia máxima de 836.00 mW y una mínima de 812.00 mW para un tiempo de operación de 60 min). Para medidas de

intensidad de la radiación sobre los tejidos se asume una potencia promedio de 820.87 mW . El láser posee óptica ajustable y longitud de onda de $808 \pm 5 \text{ nm}$ la cual se encuentra en el rango de ventana de agua, necesario para garantizar que el cultivo celular sea transparente a la radiación y únicamente sean los nanotubos los que experimenten su absorción. Ante la gran cantidad de pozos para radiar, se hizo necesario implementar un sistema de control de tiempo de operación del láser y un sistema de precisión para desplazamiento lateral de los pozos.

Para los estudios de citotoxicidad en presencia del compuesto *NTPS-PSAB* se utilizan la línea celular *colo-205* adquirida en el Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos y *1595* suministrada por el Laboratorio de Biología Experimental del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia.



Figura 3. Sistema de radiación empleado para identificar la acción térmica de nanotubos de carbono en células tumorales *1595* y *colo-255*.

Para el estudio de citotoxicidad, en cajas estériles de 96 pozos de $200 \mu\text{L}$, se disponen en filas de 8 pozos las células bajo estudio con la solución de nanotubos funcionalizados tomando como control una de las filas con células sin el compuesto.

Para los estudios de viabilidad celular se utiliza el método *MTT* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), en el cual se mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. El *MTT* es captado por las células mediante endocitosis y posteriormente reducido por la mitocondrias de las células vivas a una sal de formazan, que acumulada en los lisosomas se transporta a la superficie de las células por exocitosis. La cantidad de formazan producido resulta proporcional al número de células proliferantes.

Las células se incuban (37°C , $5\% \text{ CO}_2$) un día para permitir que se adhieran a las paredes de los pozos. Se adicionan $20 \mu\text{L}$ del compuesto *NTPS-PSAB* disuelto en agua para conseguir la concentración por pozo deseada. Los cultivos se incuban nuevamente (37°C , $5\% \text{ CO}_2$) con un tiempo de 1 día para el caso de estudio de toxicidad en función de la concentración del compuesto de nanotubos y 3 días para evaluar el comportamiento tóxico del compuesto y la radiación en función del tiempo.

Una vez cumplido el tiempo escogido para evaluar los efectos tóxicos del compuesto y radiación, se adicionan $20 \mu\text{L}$ de solución de *MTT* en cada uno de los pozos. Se

incuba nuevamente (37°C , $5\% \text{ CO}_2$) entre 1 y 4 h para permitir que el *MTT* sea metabolizado.

Una vez incubados se agregan $100 \mu\text{L}$ de *DMSO* para solubilizar el formazan. Se realiza finalmente lectura de densidad óptica a 560 nm en un lector *ELISA*. La densidad óptica resulta directamente correlacionada con la cantidad de células activas.

3. RESULTADOS

Para evaluar el grado de toxicidad de *NTPS-PSAB* se cultivan células *1595* sin y con nanotubos de carbono en concentraciones entre $0.62 \mu\text{g/ml}$ y $620 \mu\text{g/ml}$. Se realiza la medición de la densidad óptica - proporcional a la viabilidad celular- para células control sin nanotubos y para células sin y con radiación láser en intensidad de 6314 mW/cm^2 y tiempos de 3 min.

La figura 4 muestra la viabilidad para células sin y con radiación. Se hace visible la ausencia de toxicidad de los nanotubos de carbono funcionalizados con *PSAB* para las células de seno *1595*. La viabilidad celular resulta afectada por la acción de la radiación láser, aunque no resulta lo suficientemente significativa para asegurar una acción fototermolítica contundente.

A diferencia de la línea *1595*, la línea celular *colo-255* presenta un incremento de citotoxicidad en función de la concentración de nanotubos de carbono.

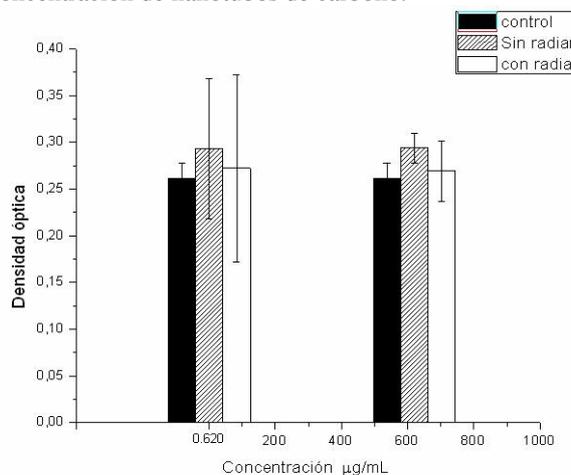


Figura 4. Densidad óptica para las concentraciones 0.620 y $620 \mu\text{g/mL}$ de *NTPS-PSAB* con y sin radiación láser para células tumorales *1595*.

Ante la sensibilidad de la línea *colo-255* a la presencia de nanotubos de carbono, se hace pertinente identificar el grado de citotoxicidad en función del tiempo de incubación de las células tumorales en presencia de nanotubos de carbono funcionalizados con *PSAB*. Para este fin, se cultivan células de *colo-255* y se mide la viabilidad celular para intervalos de tiempo entre 1 y 3 días. Las graficas de la figura 5a y 5b muestran un incremento de citotoxicidad en función de la concentración y del tiempo de incubación, así como de la acción térmica de la radiación láser.

Los resultados obtenidos muestran una marcada diferencia en la acción citotóxica de los nanotubos de carbono en función de la línea tumoral escogida. En un trabajo realizado con la línea tumoral CSC3322 [5], hemos identificado un comportamiento similar al que se registra en esta investigación, aspecto que motiva incrementar estudios con diferentes líneas celulares y funcionalización para los nanotubos de carbono utilizados como agente termoterapéutico.

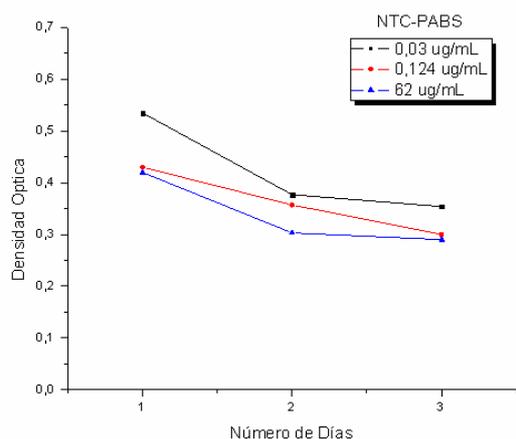


Figura 5a. Densidad óptica (~ cantidad células vivas) en función del número de días de incubación para la línea celular *colo-205* y concentraciones de *NTPS-PSAB*: 0.03, 0.124, 62 $\mu\text{g/mL}$. sin radiación láser.

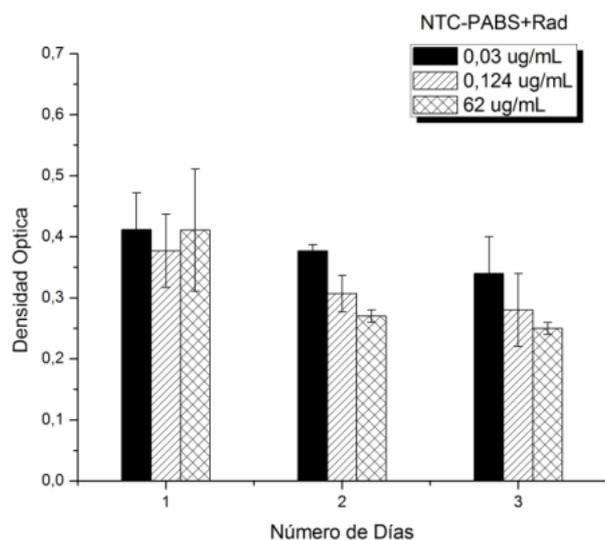


Figura 5b. Densidad óptica (~ cantidad células vivas) en función del número de días de incubación para la línea celular *colo-205* y concentraciones de *NTPS-PSAB*: 0.03, 0.124, 62 $\mu\text{g/mL}$. con radiación láser.

3. CONCLUSIONES

Para una determinada funcionalización del nanotubo de carbono de pared simple, el grado de citotoxicidad depende de la línea celular escogida. Las mediciones

realizadas de viabilidad celular para nanotubos de carbono funcionalizados con *ácido polisulfónico m-aminobenceno* muestran ausencia de toxicidad para la línea 1595, contrario a lo que ocurre para la línea celular *colo-255*, en donde aparece reducción en la viabilidad celular. La radiación láser en cultivos celulares con *NTPS-PSAB* incrementa levemente la toxicidad.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Kan, M. O'Connell, J. Wisdom and H. Dai "Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction" *PNAS*. vol. 102, pp. 11600-11605, 2005.
- [2] K. Teker, G. Cesarone, E. Wickstrom, B. Panchapakesan "Detection of live breast cancer using carbon nanotube devices" *Nanotech*. Vol 2. Pp. 33-36. 2006.
- [3] L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato and K. Kostarelos "Carbon nanotubes as nanomedicines" *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol 58. 1460-1470. 2006.
- [4] E. González, E. Gil, C. de Castro, N. Téllez "Nanotubos de carbono en ambiente biológico" Preprint 2007.
- [5] E. González, E. Gil, C. de Castro, N. Téllez, T. Ribero, F. González "Citotoxicidad in vitro de células tumorales con nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados con polisulfónico -m-aminobenceno y con polietilenglicol" *Univ. Med.* Vol. 49. 317-327. 2008.