

Nanotubo de carbono-chitosan en células HOS y THP-1

Nanotubos de carbono en células

Carbon nanotubes-chitosan in HOS and THP-1 cells

John Jairo Castillo León¹, Leidy Viviana Novoa², Fernando Martínez Ortega¹, Patricia Escobar Rivero²

RESUMEN

Introducción: Los nanotubos de carbono (NTC) son estructuras nanométricas utilizadas en el tratamiento de enfermedades, principalmente en la entrega de fármacos para terapias en cáncer. **Objetivo:** Estudiar la internalización de NTC acoplado a quitosán (NTC-Q) en células de osteosarcoma humano (HOS) y monocitos humanos de leucemia aguda (THP-1). **Materiales y métodos:** Los NTC solubilizados con quitosán 30% fueron caracterizados espectroscópicamente por UV-Vis, fluorescencia y Raman. Las células HOS y THP-1 fueron tratadas con NTC-Q y se evaluó la internalización por tinción de Giemsa en microscopio de luz y la citotoxicidad utilizando la prueba fluorométrica de Azul de Alamar. **Resultados:** Los espectros Raman y de fluorescencia mostraron la funcionalización de los NTC con quitosán. Los NTC fueron internalizados por las líneas celulares después de 24 h mostrando una ubicación citoplasmática sin presentar citotoxicidad en ninguna de las células evaluadas. **Discusión:** Las características presentadas por los NTC-Q les brinda la posibilidad de ser utilizados como transportadores de fármacos. *Salud UIS 2011; 43(1): 21-26*

Palabras clave: Nanotubos de carbono, quitosán, internalización celular

ABSTRACT

Introduction: Carbon nanotubes (CNT) are nanometer-sized structures used in medicine in the treatment of diseases, mainly in drug delivery in therapies against cancer. **Objective:** To Study the internalization of carbon nanotubes modified with chitosan (CNT-CH) in human osteosarcoma cells (HOS) and human monocytes of acute leukemia (THP1). **Materials and methods:** The CNTs solubilized in chitosan 30% were characterized spectroscopically by UV-Vis, fluorescence and Raman. HOS cells and THP-1 were treated with CNT-CH, the internalization was evaluated by Giemsa staining with light microscopy, and cytotoxicity was determined using Alamar Blue assay. **Results:** Raman and fluorescence spectra showed the functionalization of the CNT with chitosan. After 24 h the NTC were internalized in the cell lines showing a cytoplasmic location and were not cytotoxic in any of both cell lines types. **Discussion:** The properties of CNT-CH on cells allowing it to be potentially used as drug carrier. *Salud UIS 2011; 43(1): 21-26*

Keywords: Carbon nanotubes, chitosan, cell internalization cells, macrophages

1. Centro de Investigación en Catálisis, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

2. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: John Jairo Castillo León, Centro de Investigación en Catálisis, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Santander, Teléfono: 6550805; Email: johnleon76@hotmail.com

Recibido: 1 de mayo de 2010 - **Aceptado:** 30 de junio de 2010

INTRODUCCIÓN

Los nanotubos de carbono (NTC) son estructuras cilíndricas de tamaño nanométrico que gracias a sus propiedades fisicoquímicas, electrónicas y biológicas han permitido ser utilizados en casi todos los campos de las ciencias¹. En medicina han encontrado aplicación en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, por ejemplo mediante el transporte y entrega de fármacos en cáncer².

Los NTC se pueden clasificar en dos tipos diferentes según el número de capas: NTC de pared simple (NTCPS) y los NTC (NTCPM) de capa múltiple, formados por capas concéntricas (**Figura 1**). Los NTCPS están constituidos por átomos de carbono organizados en una red hexagonal cilíndrica. Los extremos pueden estar cerrados por media esfera de fullereno o pueden estar abiertos. Mientras tanto los NTCPM tienen una estructura similar a varios NTC de pared simple concéntrica con diferentes diámetros. En ambos casos la principal característica que da a los NTC sus excelentes propiedades, es que exhiben una relación longitud/diámetro elevada, esto es, su diámetro es del orden de los nanómetros y su longitud puede variar desde unas micras hasta milímetros e incluso algunos centímetros³.

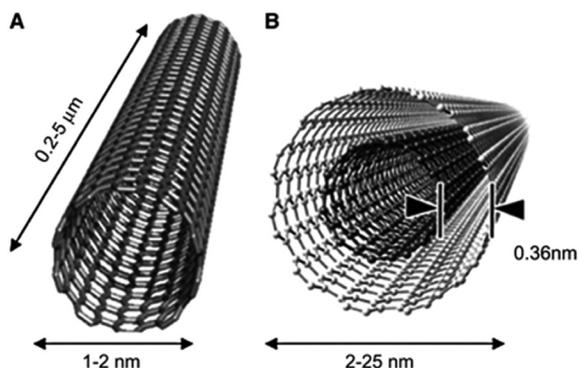


Figura 1. Nanotubos de carbono de (A) pared simple y (B) pared múltiple³

Existen diferentes metodologías para preparar los NTC, entre las cuales se destacan: la vaporización por grafito con pulsos de láser, descarga por arco eléctrico en electrodos de grafito, pirólisis y alta presión de CO³. Sin embargo estas metodologías sufren algunas limitaciones importantes como: producción de mezclas de nanotubos con diferentes longitudes, muchos defectos y variedad de torsiones⁴. Para superar algunos

de estos inconvenientes otras metodologías hacen uso de metales de transición soportados sobre materiales inorgánicos como la sílice y zeolitas⁴.

El desarrollo de nuevas metodologías para la modificación química de NTC ha estimulado la preparación de nanotubos solubles que pueden ser empleados en varias aplicaciones médicas, entre las cuales el suministro localizado de fármacos para el tratamiento del cáncer es la más promisorio⁵. La solubilidad y funcionalización de los NTC es un requisito primordial para mejorar las propiedades de biocompatibilidad en aplicaciones biológicas. Los NTC prístinos (puros) son completamente insolubles en todos los solventes, para lo cual es necesaria la funcionalización química de estas nanoestructuras⁶. Existen varias metodologías para la funcionalización química ya sea covalente o no covalente de los NTC. En la funcionalización covalente los nanotubos primero son oxidados mediante el uso de ácidos fuertes como: ácido clorhídrico, sulfúrico y nítrico. Esta oxidación crea defectos en las paredes de los NTC cortándolos, de tal manera que se generan grupos carboxílicos que incrementan la dispersión y solubilidad en soluciones acuosas⁷. En algunas ocasiones estos defectos superficiales afectan las propiedades estructurales y electrónicas de los NTC⁷, razón por lo cual se utilizan reacciones no covalentes. La funcionalización no covalente hace uso de biomoléculas y algunos tipos de detergentes, como el SDS y el Triton X-100⁸. En este caso estas moléculas “envuelven” al NTC mediante interacciones no covalentes como fuerzas de van der Waals e interacciones de apilamiento π - π .

Una vez los NTC han sido funcionalizados con moléculas bicompatibles (ADN, proteínas, enzimas, etc) pueden ingresar por medio de mecanismos como la difusión pasiva o la endocitosis y ser internalizados en el interior de la célula⁹. El ingreso de los NTC al interior de la célula ha sido aprovechado para utilizarlos como vehículos para entrega y transporte de fármacos. Varios experimentos en células cancerígenas han utilizado a los NTC funcionalizados con fármacos como la anfotericina B⁶, doxorubicina¹⁰, paclitaxel¹¹, etc.

El quitosán es una de las moléculas utilizadas para la funcionalización y solubilización de NTC¹² y es un biopolímero (polisacárido) de origen marino, que se encuentra presente en el caparazón de algunos moluscos¹³. Debido a su origen natural y a su baja toxicidad ha encontrado aplicación en el campo biomédico. Recientemente varios trabajos han utilizado el quitosán para la entrega de fármacos para el

tratamiento del cáncer de pulmón¹². Las propiedades en la entrega de fármacos del quitosán libre son mejoradas cuando el quitosán es funcionalizado sobre la superficie de NTC¹³.

Debido a las razones mencionadas anteriormente en este trabajo se utilizó el quitosán funcionalizado no covalentemente a los NTC para estudiar la internalización en dos tipos de líneas celulares: HOS y THP1.

METODOLOGÍA

Solubilización y funcionalización de NTC-Q

Los NTC de pared simple fueron adquiridos comercialmente (Sigma, USA) y funcionalizados con una solución acuosa de quitosán 30% mediante ultrasonido durante 1 hora. La solución NTC-Q fue centrifugada durante 20 minutos a 2800 rpm. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y el sólido fue descartado, debido a que en el sólido están presentes impurezas y conglomerados insolubles de NTC¹⁴. Luego los NTC-Q fueron almacenados a 4°C para los ensayos biológicos. Finalmente los NTC-Q fueron caracterizados por espectroscopia UV/Vis, de fluorescencia y de Raman. Los resultados de la caracterización de UV/vis fueron obtenidos y analizados por medio de sus respectivos espectros expresados en unidades de absorbancia contra longitud de onda (nm), en la espectroscopia de fluorescencia los espectros se obtuvieron en unidades arbitrarias de fluorescencia contra longitud de onda (nm) y en el caso de la espectroscopia Raman unidades arbitrarias de intensidad contra desplazamiento químico (cm⁻¹).

Líneas celulares

Las líneas celulares de osteosarcoma humano (HOS, ATCC) y los monocitos humanos de leucemia aguda (THP-1, ATCC), se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi), 0,1% de penicilina-estreptomina a 37°C, 5% CO₂, 95% mezcla-aire.

Prueba de internalización

Las células HOS fueron colocadas en placa de 24 pozos con laminillas circulares en el fondo por 24 h. Las células THP-1 fueron colocadas en las mismas condiciones por 72 h adicionando forbol miristato acetato (PMA) para lograr su transformación al fenotipo adherente. Ambas líneas celulares fueron tratadas con NTC-Q

a una concentración de 0,165 mg/mL por un periodo de 4 h a 48 h a 37°C, 5% de CO₂, 95% mezcla-aire. Posteriormente, se determinó el porcentaje de células que internalizaban el cual fue calculado por recuento de 300 células en microscopio luz, en células fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Se consideró como internalización positiva toda célula en la que se observaba claramente la agrupación de NTC-Q intracelularmente.

Prueba de citotoxicidad

Las células HOS y células THP1 transformadas con PMA en placa de 96 pozos fueron tratadas con cinco diferentes concentraciones de NTC-Q (0,33-0,021 mg/mL) durante 24 h a 37°C, 5% CO₂, 95% mezcla-aire. Células controles fueron tratadas con miltefosina o dejadas con medio de cultivo sin compuesto. Como blanco se utilizaron pozos que contenían AB sin células. La citotoxicidad fue determinada por el método fluorométrico de Azul de Alamar (AlamarBlue Biosource, AB). Las células fueron incubadas con AB y se cuantificó la intensidad de fluorescencia (IF) utilizando un fluorómetro (Perkin Elmer L5) con lecturas a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm. El porcentaje de citotoxicidad se determinó con la fórmula $(1 - (IF \text{ grupo tratado} / IF \text{ grupo control}) * 100)$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilización y caracterización espectroscópica de NTC-Q

Los NTC de pared simple fueron solubilizados mediante sonicación y centrifugación de una solución acuosa de quitosán 30%. En la (Figura 2) se observan los NTC-Q totalmente homogenizados, lo cual demuestra la solubilización de los NTC. Similares resultados se obtuvieron en otros trabajos realizados con quitosán^{15,16}.

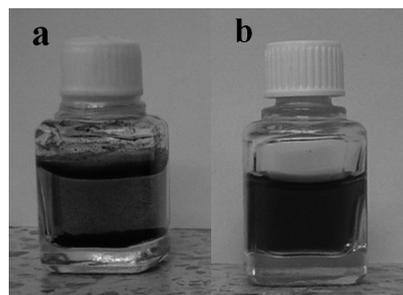


Figura 2. Nanotubos de carbono antes (a) y después de la solubilización (b) en quitosán 30%

El análisis por espectroscopia UV/Vis mostró una banda de máxima absorbancia a 265 nm característica de los fonones resonantes y de las transiciones electrónicas de los electrones pi presentes en la estructura del grafeno. Esta banda característica ha sido observada en otros trabajos con NTC¹⁴.

Una de las características de los NTC es el efecto de apagamiento de la fluorescencia (quencher) cuando interacciona con compuestos que tienen fluorescencia¹⁷. Este efecto fue observado en este trabajo. En la (Figura 3) se aprecia la emisión del quitosán a una $\lambda = 418$ nm, esta emisión desaparece o es apagada casi en su totalidad cuando el quitosán está unido al NTC.

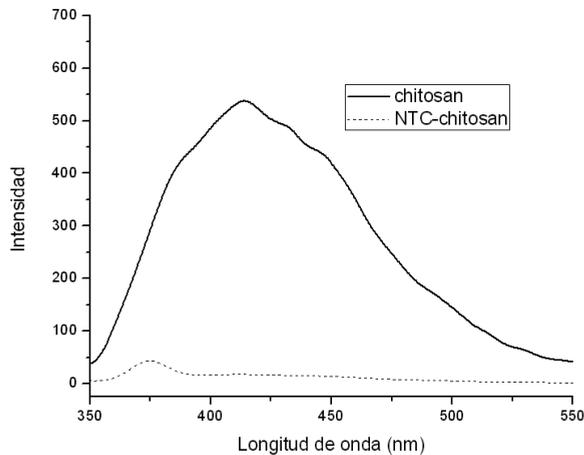


Figura 3. Espectro de emisión de fluorescencia de quitosán y NTC-chitosán.

La espectroscopia Raman es una herramienta muy útil en la cual la muestra se excita con una láser de energías entre 2,60 y 1,17 eV (477 y 1064 nm respectivamente), precisamente en el rango de algunas de las transiciones ópticas de los NTC, por lo que se puede esperar que esta espectroscopia aporte información sobre la estructura de los NTC¹⁸. Los espectros Raman de los NTC y NTC-Q se pueden observar en la (Figura 4), se identificaron las bandas características D y G, denominadas banda de desorden inducido y banda de elongación o vibración tangencial respectivamente. La banda D es indicadora de la presencia de defectos en las paredes, de manera que de la relación de intensidades entre las bandas D y G puede afirmarse que el NTC presenta quitosán en sus alrededores. La relación de intensidades de las bandas G (vibración tangencial) y D (desorden inducido) de NTC y NTC-Q fueron de 0,0637 y 0,096 respectivamente. El aumento en el valor de la relación de las intensidades

I_D/I_G es un indicio de la funcionalización de los NTC con el quitosán. Esta relación de intensidades entre las bandas D y G ha servido también para evaluar cuantitativamente la funcionalización de NTC con agentes dispersantes como dodecil benzenosulfonato de sodio (SDBS)¹⁹.

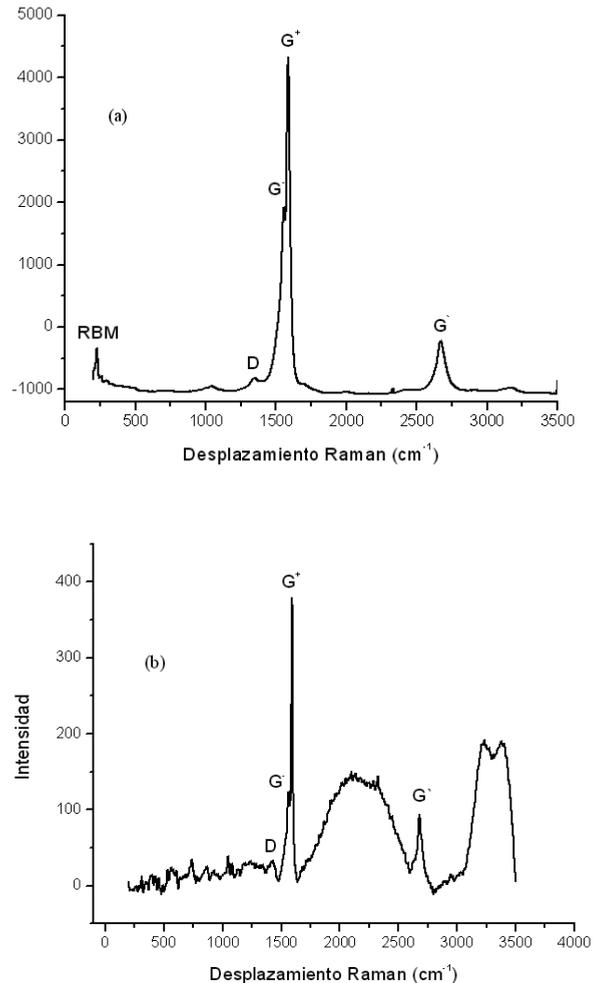


Figura 4. Espectroscopia Raman de (a) NTC y (b) NTC-chitosán.

Las células HOS y THP-1 internalizaron los NTC-Q

Las células HOS y THP-1 internalizaron los NTC-Q con algunas diferencias. En las células HOS, se observó internalización del NTC-Q a partir de las 4 h de incubación, siendo esta mayor después de 24 y 48 h de incubación con % de internalización de 8,0, 42,3% y 78,0% respectivamente. Las células THP-1 mostraron una agrupación intracelular de NTC-Q a las 24 y 48 h de

incubación con % de internalización de 36,3 y 65,7 % respectivamente. La internalización de los NTC-Q por las células HOS se observa en la (Figura 5 a y b) y por las células THP-1 en la (Figura 5 c y d). Ambas líneas celulares presentaron una única ubicación intracelular del compuesto en una posible vacuola, sin observarse dispersión de los NTC en toda la estructura celular.

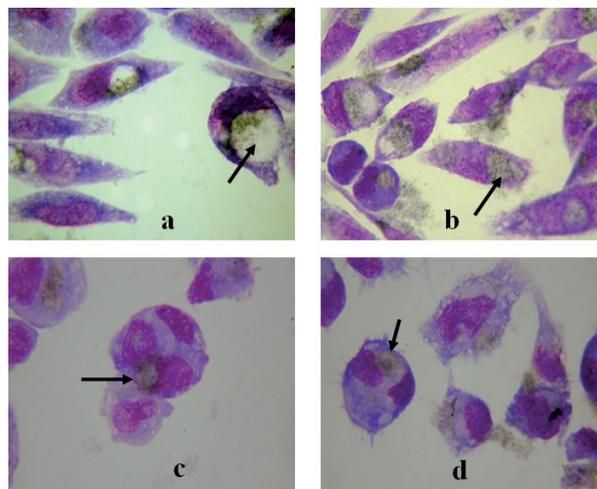


Figura 5. Internalización de NTC en células HOS y THP1 a las 24 y 48 h. Coloración Giemsa, observación en microscopio de luz transmitida, Aumento: 100X. a. Células HOS, 24 h; b. Células HOS, 48 h; c. Células THP-1, 24 h; d. Células THP-1, 48h. Las flechas indican el compuesto NTC-Q

La internalización de NTC de pared simple funcionalizados con ácido fólico, ha sido reportada en varias líneas celulares como en células de carcinoma hepato-celular humano (Hep-G2), donde se registra internalización desde la primera hora completándose a la tercera hora de incubación²¹. Sin embargo, no se reporta una única agrupación de los NTC en el citoplasma, esta característica en nuestros resultados puede estar dada por la funcionalización de los NTC con el quitosan, el cual como se ha reportado en la literatura forma protuberancias en la superficie de los nanotubos de carbono provocando la formación de paquetes unidos por quitosan²². 0,165 mg/mL

Los NTC-Q no fueron citotóxicos

Los NTC-Q no fueron citotóxicos a la concentración utilizada en los ensayos de internalización (0,165 mg/mL). La máxima concentración evaluada en este

trabajo, de 0,33 mg/mL, presentó un bajo porcentaje de toxicidad en las células HOS y THP1 siendo éste de 31,46 y 8,32 % respectivamente. Concentraciones menores no fueron tóxicas para las células. La miltefosina, utilizada como control de muerte, fue tóxica para las células presentando a concentraciones tan bajas como 0,081 mg/mL un porcentaje de muerte celular mayor del 99 % para HOS y THP-1.

Son diversos y discutidos los resultados que se reportan en la literatura sobre la toxicidad de los NTC especialmente aquellos que utilizan el método del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) como prueba. Se plantea que muchos de los resultados reportados podrían ser erróneos ya que al parecer los NTC podrían interferir con la formación del compuesto coloreado formazan que se produce al reducirse el MTT por acción de enzimas mitocondriales de las células vivas²⁴. Estudios realizados en células embrionarias de riñón humano (HEK293), utilizando como prueba de citotoxicidad el método MTT, reportan una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis de NTC, pero en concentraciones mucho menores que las reportadas en este trabajo (de 0,78125 µg/mL hasta 200 µg/mL)²³.

CONCLUSIÓN

Una vez preparado y caracterizado los NTC funcionalizados con quitosan, se determinó que estos son internalizados sin presentar toxicidad en algunas células de mamífero. Este resultado abre el camino para la utilización de estos nanocompuestos como vectores de fármacos o de otros tipos de biomoléculas para el tratamiento de cáncer y de diferentes enfermedades que involucren microorganismos intracelulares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo con el proyecto 1102254921468 y por la beca de doctorado de JC.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores manifestamos no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Fukumori YI. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv Pow Tech* 2006; 17: 1-28.
2. Ji SR, Zhang B, Yang F, Xu J, Long J, Jin C, Fu D, Ni Q, Yu X. Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. *Biochem et Biophys Acta* 2010; 1806: 29-35.
3. Dresselhaus G, Dresselhaus M, Avouris P. Carbon nanotubes: Synthesis, structure, properties and applications. Springer-Verlag 2001, Berlin.
4. Huber JG, Romero JM, Rosolen JG, Luengo CA. *Quim Nova* 2004; 27: 986-992.
5. Liu Z, Cheng C, Davis S, Sherlock S, Cao Q, Chen X, Dai H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res* 2008; 68: 6652- 6660.
6. Wu W, Pastorin G, Klumpp C, Benincasa M, Briand JP, Gennaro R, Prato M, Bianco A. Targeted delivery of amphotericin B to cells using functionalised carbon nanotubes. *Angewandte Chem Int* 2005; 44: 6358-6352.
7. Liu J, Rinzler A, Dai H, Hafner J, Bradley J, Boul K, Lu J, Iverson T, Shelimov K, Huffman C, Rodriguez-Macias C, Shon Y, Lee T, Colbert D, Smalley R. Fullerenes Pipes. *Science* 1998; 280: 1253-1256.
8. Rastogi R, Kaushal R, Tripathi S, Sharma A, Kaur I, Bharadwaj L. Comparative study of carbon nanotubes dispersion using surfactants. *J Colloid Interface Science* 2008; 328: 421-428.
9. Kang B, Chang S, Dai Y, Yu D, Chen D. Cell response to CNT: Size-Dependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate. *Small* 2010; 6: 2362-2366.
10. Heister E, Neves V. Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. *Carbon* 2009; 47: 2152-2160.
11. Zhang X, Meng L, Lu Q. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials* 2009; 30: 6041-6047.
12. Mohapatra S, Kumar A. Method of drug delivery by carbon nanotube-chitosan nanocomplex. *US20080214494*.
13. Beg S, Rizwan M, Sheikh A, Hasnain S, Anwer K, Kohli K. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. *J Pharm Pharmacol* 2010.
14. Attal S, Thiruvengadathan R, Regev O. Determination of the concentration of single-walled carbon nanotubes in aqueous dispersion using UV-Visible absorption spectroscopy. *Anal Chem* 2006; 78, 8098-8104.
15. Zhang M, Smith A, Gorski W. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. *Anal Chem* 2004; 76: 5045-5050.
16. Takahashi T, Luculescu C, Uchida K, Ishii T, Yajima H. Dispersion behaviour and spectroscopic properties of single-walled carbon nanotubes in chitosan acidic aqueous solutions. *Chem Lett* 2005; 34: 1516-1517.
17. Zhu Z, Tang Z, Philips J, Yang R, Wang H, Tan W. Regulation of Singlet Oxygen generation using single walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 10856-10857.
18. Domingo C, Santoro G. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Óptica Pura y Aplicada* 2007; 40: 175-186.
19. Salzmann Ch, Chu B, Tobias G, Llewellyn S, Green M. Quantitative assessment of carbon nanotubes dispersions Raman spectroscopy. *Carbon* 2007; 45: 907-912.
20. Ren H, Cheng X, Liu J, Gu N, Huang X. Toxicity of single walled carbon nanotubes: How we were wrong?. *Materials Today* 2010; 13: 6-8.
21. Kang B, Yu D, Dai Y, Chang S, Chen D, Ding Y. Cancer-cell targeting and photoacoustic therapy using carbon nanotubes as “Bomb” agents. *Small*. 2009; Doi: 10.1002/sml.200801820.
22. Liu Y, Tang J, Chen X, Xin J.H. Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon N.Y.* 2005; 43: 3178-3180.
23. Cui D, Tian F, Ozhan C.S, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 2005; 155: 73-75.
24. Worle-Knirsch J.M, Pulskamp K, Krug H.F. Oops They did it again! Carbon nanotubes hoax Scientists in viability assays. *Nano Lett* 2006; 6(6): 1261-126.