

Evaluación de las propiedades fotodinámicas de puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina y ácido cítrico como posible agente fototerapéutico

Carlos Arturo Rueda Parra

Trabajo Dirigido

Tutores

**Alejandro Oyono Ondo Méndez, PhD
Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Carlos y Patricia por su apoyo incondicional en cada instante de mi vida. Han sido el pilar en mis éxitos y un firme consuelo en mis fracasos. De ellos he aprendido el valor de crecer sin olvidar mis raíces y el inefable significado de la familia. Lo que soy hoy en día, más que producto de mi esfuerzo, es el reflejo de su amor y dedicación.

Agradezco a los profesores Diana Consuelo Rodríguez Burbano y Alejandro Oyono Ondo Méndez por su paciencia y dedicación. Su proceso de tutoría ha sido impecable y encuentro en ustedes una gran fuente de inspiración. De ustedes he heredado el amor por la ciencia y la investigación y he aprendido la importancia de la calidez humana.

Quiero agradecer especialmente a Hernan, Juan y Sonia. La pasión y la entrega que sienten por su trabajo marcaron una gran diferencia en mi desarrollo como profesional. De ustedes me llevo innumerables aprendizajes que atesoraré a lo largo de mi crecimiento académico y personal.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su disposición para ayudar y compartir su conocimiento. Especialmente agradezco a Natalia Ochoa por su gran apoyo durante el proceso de mi trabajo y por su gran disposición.

Por último, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas a lo largo de esta carrera. Especialmente a los doctores Oscar Julian Perdomo y Álvaro David Orjuela por su inmensa voluntad para transmitir sus conocimientos con sentido de humildad y responsabilidad. Con sinceridad los admiro y sería entrañable encontrarlos de nuevo en otro momento de mi vida profesional.

Resumen

Los puntos de carbono con emisión azul son potencialmente oxidantes cuando se irradian con una longitud de onda de 365nm. Este efecto oxidante puede resultar beneficioso para aplicaciones concernientes a la fototerapia. El principio de esta técnica para el tratamiento del cáncer es generar especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de la conversión fototérmica en el interior de las células cancerosas. Esta conversión genera una hipertermia localizada que produce hidrólisis dentro del citosol de las células y como consecuencia genera ROS. Estas terapias suelen estar reforzadas con agentes fotosensibilizantes, que son básicamente moléculas que intensifican el estrés oxidativo produciendo ROS, por un mecanismo diferente a la hidrólisis generada por el calor, conocido como efecto fotodinámico. El objetivo de este proyecto es evaluar las propiedades fotodinámicas de los puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina y ácido cítrico para su potencial uso como agente antitumoral. Para corroborar esta hipótesis, se sintetizaron puntos de carbono a partir de ácido cítrico e isoleucina por el método de reacción asistida por microondas. Este material fue evaluado en tres aspectos fundamentales, en un principio se analizaron las propiedades fisicoquímicas con el fin de tener un punto de partida para el diseño de la nanoplataforma con potencial antitumoral. En este punto, se obtuvieron los espectros de absorción y emisión que se emplearon para analizar la huella óptica de los PC-IS@AC. Estos exhibieron una absorbancia centrada entre 200nm y 300nm y una fluorescencia entre 430nm y 450nm al ser irradiados con una longitud de onda de 365nm. Adicionalmente, se analizó la composición superficial de los PC-IS@AC por medio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier donde se encontraron las hibridaciones sp^2 y sp^3 características de los puntos de carbono y grupos funcionales nitrogenados que contribuyen con la fluorescencia azul.

Este material fue sometido a una prueba de citotoxicidad a través de un ensayo MTT en células 3T3. Para esto se evaluó la viabilidad metabólica en las células tratadas con PC-IS@AC dispersados en medio a concentraciones de 500 μ g/mL, 50 μ g/mL y 5 μ g/mL. Este ensayo mostró una buena viabilidad para la línea celular 3T3, donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de concentración. Por último, se evaluó el efecto oxidante de los puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina y ácido cítrico (PC-IS@AC) al ser incubados en células 3T3 para una concentración de 500 μ g/mL, que es la máxima propuesta que demostró ser no citotóxica. En esta prueba, se analizó la concentración de ROS post-irradiación en células tratadas con PC-IS@AC, células en medio de cultivo completo, medio de cultivo incompleto con PC-IS@AC y medio de cultivo incompleto sin PC-IS@AC. En general no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Con base en los resultados, se obtuvieron puntos de carbono con emisión azul que mostraron ser no citotóxicos para la línea de células 3T3 en las concentraciones propuestas. No obstante, el efecto oxidante de los PC-IS@AC no pudo ser definido en su totalidad dado que no se encontraron diferencias significativas entre la oxidación inducida en las células tratadas con PC-IS@AC y las células sin tratamiento.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
1. Introducción	1
1.1. Justificación	1
1.2. Contribuciones	2
2. Estado del arte	3
2.1. Puntos de carbono	3
2.2. Puntos de carbono en aplicaciones como agentes antitumorales	4
2.3. Efecto oxidante en los puntos de carbono	6
3. Objetivo de la investigación	8
3.1. Pregunta de investigación	8
3.2. Objetivos	8
3.2.1. General	8
3.2.2. Específicos	8
4. METODOLOGÍA	9
4.1. Síntesis de PC-IS@AC	10
4.2. Caracterización de los PC-IS@AC	11
4.2.1. espectroscopia UV-Vis	11
4.2.2. espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	11
4.3. Ensayo MTT	12
4.4. Especies reactivas de oxígeno	13
4.4.1. Curva de calibración	14
4.4.2. Incubación de PC-IS@AC	14
4.4.3. Irradiación y cuantificación de ROS	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Caracterización de puntos de carbono	16
5.2. Ensayo MTT	19
5.3. Cuantificación de ROS	21
6. Conclusiones	27

7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	28
7.1. Recomendaciones	28
7.2. Trabajos futuros	28
ANEXO	31

Índice de figuras

2.1. Principio de funcionamiento del efecto dieléctrico producido por la reacción asistida por microondas.	4
2.2. Principio de funcionamiento, terapia combinada en cáncer hepático con nanopartículas de metales líquidos funcionalizadas.	6
2.3. Mecanismo por el cual los puntos de carbono que exhiben una fluorescencia azul generan ROS.	7
4.1. Diagrama de flujo para la metodología propuesta.	9
4.2. Síntesis de puntos de carbono, reacción asistida por microondas.	10
4.3. Procedimiento del ensayo MTT para células 3T3 con PC-IS@AC.	12
4.4. Caja de 96 pozos, prueba MTT en células 3T3 con PC-IS@AC a 500µg/mL, 50µg/mL y 5µg/mL.	13
4.5. Principio de funcionamiento de la sonda fluorescente para la cuantificación de ROS.	14
4.6. Incubación de PC-IS@AC	15
4.7. Incubación e irradiación de la sonda de ROS	15
5.1. Emisión de PC-IS@AC en ausencia y bajo irradiación de luz de 365 nm.	16
5.2. Espectro de absorción para los puntos de carbono.	17
5.3. Espectro de emisión, PC's irradiados con 365nm.	18
5.4. FTIR, puntos de carbono sintetizados con isoleucina y ácido cítrico	18
5.5. Viabilidad MTT para células 3T3 tratadas con PC-IS@AC a concentraciones de 5µL/mL, 50µL/mL y 500µL/mL.	19
5.6. Curva de calibración de ROS presentada en escala logarítmica construida con los parámetros expuestos en la sección 4.4.1, DCF estándar diluido en medio de cultivo incompleto.	21
5.7. Resultados para la intensidad de fluorescencia (tabla 5.3) comparados con la curva de calibración de ROS (tabla 4.1).	22
5.8. Concentración de ROS en células 3T3 irradiadas con 365nm y no irradiadas, tratadas con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC. (IRR: irradiado, irr: sin irradiar.	23
5.9. Concentración de ROS en células 3T3 irradiadas con 365nm tratadas con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.	24
5.10. Concentración de ROS en medio incompleto irradiado con 365nm y sin irradiar, tratado con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.	24
5.11. Lámpara UV con un foco no coherente irradiando una caja de 96 pocillos.	26

Índice de tablas

4.1. Dilución en cascada, curva de calibración	14
5.1. Análisis de normalidad y homocedasticidad de los datos de absorbancia para el ensayo MTT en células 3T3 tratadas con PC-IS@AC	20
5.2. Análisis de Varianza de un factor (prueba ANOVA) para el ensayo MTT en células 3T3 tratadas con PC-IS@AC.	20
5.3. Resultados de la regresión para hallar los valores de concentración tomando como base la intensidad de la fluorescencia.	22
5.4. Resultados de la prueba T para para la concentración de ROS en las muestras irradiadas de células 3T3 con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.	23
5.5. Análisis de Varianza de un factor (prueba ANOVA) para la producción de ROS en medio con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.	25

Capítulo 1

Introducción

1.1 Justificación

La nanotecnología ha jugado un rol fundamental en muchos campos de la ciencia como la medicina [1]. Específicamente, los puntos de carbono han demostrado ser materiales muy versátiles que se pueden utilizar en una gran variedad de aplicaciones, dadas sus atractivas propiedades ópticas y fisicoquímicas [2]. Poseen una variedad de propiedades útiles, como una alta capacidad de adsorción, una alta conductividad térmica y eléctrica, y una alta resistencia a la oxidación [3, 4]. Además, algunos de estos al ser irradiados presentan un efecto oxidante que puede resultar útil en la fototerapia, ya que se puede utilizar para destruir las células cancerosas sin dañar las células sanas [5]. La fototerapia es un tratamiento seguro ya que utiliza luz de baja energía para destruir las células cancerosas.

Esta forma de tratamiento para combatir el cáncer se fundamenta en concentrar energía en áreas muy pequeñas y específicas de tejido [6]. Su efecto principal es generar daño a la célula por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a causa de la hidrólisis o por moléculas con propiedades fotodinámicas [7]. Este efecto contribuye con la muerte celular aumentando el estrés oxidativo que toleran la células y está directamente relacionado con los buenos resultados de los tratamientos [8].

Tomando como referencia la importancia del estrés oxidativo para tratar el cáncer, se sabe que este efecto oxidante es de alta utilidad para la medicina, que está buscando potenciar el daño a las células cancerosas [6, 1]. De allí deriva el interés por generar agentes oxidantes que inflijan un daño adicional y que a su vez, sean selectivos y dinámicos. Los puntos de carbono, son nanopartículas de aproximadamente diez nanómetros de diámetro que han mostrado un gran potencial en el área [4, 9, 10]. Su citotoxicidad ha demostrado ser baja [11]. Pueden ser superficialmente modificados con ligandos, proteínas y otras moléculas que les permitan, por ejemplo, ser más selectivos o parcialmente invisibles para el hígado y los riñones con el fin de prolongar su acción en el metabolismo antes de ser degradados [12]. Además, se han reportado diversos tipos de síntesis y dopaje, que los hacen dinámicos en términos de emisión y afinidad con diferentes tejidos [13].

En la literatura se ha reportado el uso de puntos de carbono en diferentes terapias alternativas contra el cáncer [12]. Estos se han dopado con heteroátomos como nitrógeno, cobre,

gadolinio, entre otros [14]. No obstante, un estudio publicado por Christensen *et al*, postula a los puntos de carbono puros como agentes oxidantes cuando se exponen a irradiación con luz azul [5]. En este postulado, se sugiere que los PC's irradiados tienen la capacidad de generar un oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una de las ROS con menor vida media, pero con mayor potencial reactivo [15]. El objetivo de este trabajo, es generar una nanoplataforma basada en puntos de carbono con propiedades fotodinámicas, que pueda ser empleada como un potencial agente antitumoral y responda a la necesidad de potenciar el efecto tóxico específico hacia las células cancerosas.

1.2 Contribuciones

Inicialmente, la realización de este trabajo está contribuyendo al desarrollo de nuevos conocimientos en el área de la ciencia de materiales. Asimismo, tomando en consideración los objetivos planteados, se espera que los resultados obtenidos para la viabilidad celular en la línea 3T3, y la caracterización oxidante de los puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina, constituyan la base para el desarrollo de una nanoplataforma con potencial antitumoral. Idealmente, esta aproximación en la investigación busca contribuir con el desarrollo de una terapia coadyuvante contra el cáncer, teniendo como etapa previa, la continuación del protocolo aquí descrito en células cancerosas.

Capítulo 2

Estado del arte

En este capítulo se exponen los puntos de carbono y sus propiedades oxidantes bajo irradiación con una longitud de onda entre 400nm y 450nm, asimismo, presenta generalidades sobre las especies reactivas de oxígeno, su impacto en las células y su aplicación como efecto deseado en los tratamientos para combatir el cáncer.

2.1 Puntos de carbono

Los puntos de carbono (PC) son materiales nanométricos compuestos de átomos de carbono [4]. Este material ha recibido el nombre de "puntos" por su morfología cuasi esférica cuyos diámetros oscilan entre 5nm y 10nm. Se caracterizan por tener una gran área superficial, en la que comúnmente se encuentran diferentes grupos funcionales que les pueden conferir un carácter hidrofílico o les ayudan a mejorar su biocompatibilidad [3]. Varios estudios relacionan la pasivación en su superficie, con propiedades estructurales y ópticas mejoradas en relación a los puntos de carbono sin ningún tipo de modificación post sintética [16, 17]. La estructura final de los PC depende en gran medida de los precursores, solventes y método de síntesis [18], además, de esta estructura final, dependen también varias de las características que más los representan como la fotoluminiscencia [16].

La síntesis de los puntos de carbono se realiza mediante dos vías que suponen principios opuestos. La primera consiste en armar las nanopartículas desde unidades atómicas que suelen estar en escala molecular hasta llegar a la escala manométrica, es decir ir de lo más pequeño a lo más grande "Bottom-Up"[11, 4]. La segunda vía de síntesis, supone hacer lo contrario. Allí se utilizan grandes bloques de precursores de carbono como grafeno u hollín. Estos precursores se empiezan reducir en tamaño induciéndoles altas cantidades de energía usualmente en forma de calor "Top-Down", como por ejemplo, la ablación láser y el tratamiento con plasma [19].

Para el método "Top-Down", resulta difícil controlar el tamaño de las partículas o el rendimiento cuántico de la fotoluminiscencia [4]. Por esta razón es más frecuente ver técnicas de "Bottom-Up", como la síntesis hidrotermal, solvotermal, la pirólisis y las reacciones asistidas por microondas (PC-M)[20]. Esta última es de gran interés en el campo porque es un proceso sencillo y rentable para sintetizar PC, mediante la irradiación de compuestos orgánicos con radiación electromagnética a longitudes de onda que van de 1 mm a 1 m [21]. Su principio de

funcionamiento consiste en la capacidad que tienen las diversas moléculas polares, presentes en los compuestos orgánicos, para convertir las microondas en calor. Este efecto, llamado calentamiento dieléctrico, consiste en el hecho de que los elementos no conductores tienen campos electrostáticos que constantemente están buscando mantener la estabilidad de las cargas. Un aumento de energía que fluctúa constantemente en el tiempo, como es el caso de las microondas, genera movimientos en la estructura del dieléctrico y esto genera calor por fricción [22] (la figura 2.1 [23]).

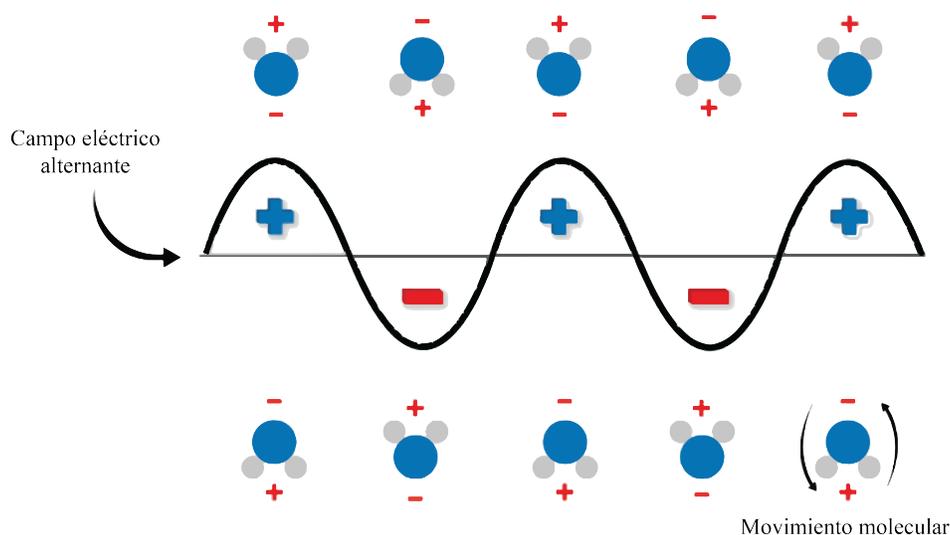


Figura 2.1: Principio de funcionamiento del efecto dieléctrico producido por la reacción asistida por microondas.

De las mayores ventajas que presenta la PC-M es que es rápida y considerablemente más eficiente porque el calentamiento es casi inmediato y asimismo, la reacción puede detenerse de forma instantánea evitando pérdidas de material por sobrecalentamiento [24, 21]. Además, como las moléculas dieléctricas suelen estar dispersadas de manera homogénea en la solución de la reacción, la distribución del calor también es homogénea, permitiendo que en el material sintetizado se encuentren pocos residuos que inevitablemente tendrían que removerse en una etapa rigurosa de purificación [24].

2.2 Puntos de carbono en aplicaciones como agentes antitumorales

El uso de puntos de carbono en aplicaciones biomédicas está creciendo rápidamente debido a sus atractivas propiedades. Estas nanopartículas son extremadamente versátiles y se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones biomédicas, desde la fabricación de dispositivos médicos hasta el tratamiento de enfermedades [4]. En esta larga lista, se encuentran su uso en biosensores, liberación controlada de fármacos y aplicaciones relacionadas con los diversos potenciadores en los tratamientos antitumorales [25, 11]. En este caso, para entender mejor su uso como agente antitumoral, es importante entender el cáncer como una enfermedad metabólica con numerosas variantes que necesitan ser abordadas de forma específica [7, 6].

El cáncer está dentro de las principales causas de muerte a nivel global [26]. Según la organización mundial de la salud, para el 2020 se reportaron cerca de 10 millones de muertes relacionadas [26]. Este gran grupo de patologías que puede comprometer diferentes tejidos, suele derivar de la transformación que existe de las células sanas a células tumorales que tienen una alta capacidad de crecimiento y proliferación [26], en consecuencia, se genera un consumo de recursos y energía constante y desproporcionado, que induce un estado de desnutrición en el tejido circundante y en general un ritmo aletargado en el organismo [7].

Su tratamiento suele implicar la resección de las áreas afectadas; no obstante, esto no siempre es necesario, o incluso posible, teniendo en cuenta el tamaño de los tumores o su compleja geometría y compromiso con tejidos de alta importancia para el soporte vital [7]. Es por esto que a lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos no quirúrgicos que velan por generar un daño focalizado en las células de interés [6]. Allí, se encuentran los tratamientos con energía ionizante, como la radioterapia, los tratamientos con luz de baja energía que generan una hipertermia localizada, como la fototerapia y tratamientos con moléculas fotosensibilizantes, como la terapia fotodinámica. [6]. En los dos primeros casos, existe un efecto directo generado por la alta transferencia de energía que rompe las cadenas de ADN en el núcleo, induciendo la muerte celular y evitando así la proliferación desmedida de las células cancerosas [6, 7]. Sin embargo, en la fototerapia, se ve más un efecto indirecto, que es la producción de especies reactivas de oxígeno que aumentan el estrés oxidativo [8, 7].

Este efecto es el objetivo principal de la terapia fotodinámica, que consiste en ingresar un agente que no es tóxico cuando no está siendo irradiado, pero que se vuelve tóxico bajo una irradiación con longitud de onda específica [7]. Las ROS tienen la habilidad de interactuar con la doble hélice del ADN generando rupturas y cambios irreparables en el material genético, de esta manera, el efecto indirecto anteriormente descrito contribuye con los procesos de muerte celular [6].

La figura 2.2 muestra un ejemplo claro de cómo se ven ambos efectos al interior de la célula en una terapia que combina los principios de la radioterapia, la fototerapia y la terapia fotodinámica. En [8] emplean nanopartículas de metales líquidos funcionalizados con ácido arginilglicospártico (RGD), que sirve de ligando con un receptor de RGD sobreexpresado en las células cancerosas en el hígado. Asimismo emplean metronidazol (MN) como radiosensibilizante y polietilenglicol (PEG) y ácido poliacrílico (PAA) como un método que prolonga la circulación de las nanopartículas por el torrente sanguíneo, haciéndolas parcialmente invisibles para el hígado y el riñón. La imagen 2.2 ilustra cómo las nanopartículas son endocitadas por las células luego de que el RGD se une al receptor de RGD. Una vez en el citosol, son irradiadas con rayos X e infrarrojo cercano. Las nanopartículas empiezan el proceso de conversión fototérmica generando un aumento súbito de temperatura y ROS. Luego liberan el MN que al ser irradiado se tiene la capacidad de romper fragmentos de ADN y dañar el material genético de la célula al igual que la alta cantidad de energía ionizante de los rayos X.

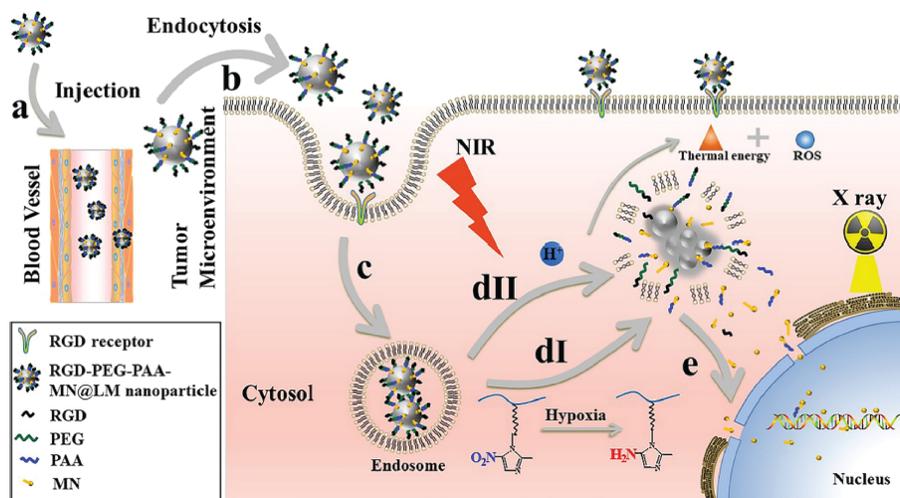


Figura 2.2: Principio de funcionamiento, terapia combinada en cáncer hepático con nanopartículas de metales líquidos funcionalizadas.

El estrés oxidativo, está siendo aprovechado como un efecto esperado en el desarrollo de nuevos tratamientos antitumorales [18]. Gethachew *et al* utilizan puntos de carbono dopados con heteroátomos de cobre, para generar conversión fototérmica bajo irradiación láser como una terapia antitumoral cooperativa [27]. Otro estudio realizado por Hou *et al*, utiliza los puntos de carbono funcionalizados al molibdeno para generar hipertermia al ser excitados con Irradiación IR-cercano (NIR). Adicionalmente, los autores sugieren que esta nanoplataforma puede superar una de las grandes complicaciones de algunos los tumores como el glioblastoma, la hipoxia [12]. Los tumores donde se presenta hipoxia son más resistentes a la radioterapia y a la fototerapia porque, bajo esta condición, la cantidad de oxígeno es limitada, luego, sin oxígeno que pueda ser transformado en ROS, el estrés oxidativo disminuye drásticamente. Hou *et al*, sugieren que sus nanopartículas pueden aumentar el flujo sanguíneo en los tumores con hipoxia, para generar un estado transitorio de normoxia y potenciar el efecto oxidante.

2.3 Efecto oxidante en los puntos de carbono

Un estudio publicado por Christensen *et al*, postula a los puntos de carbono puros como agentes oxidantes cuando se exponen a irradiación con luz azul. En este postulado, se sugiere que los PC's irradiados tienen la capacidad de generar un oxígeno singlete (1O_2) como se observa en la figura 2.3, una de las ROS con menor vida media, pero con mayor potencial reactivo [5]. El potencial oxidante y su significancia en la aplicación de puntos de carbono como agente antitumoral depende de la especie reactiva de oxígeno que se produzca. Si bien el postulado anterior trata del 1O_2 , los autores también mencionan a las ROS comunes. El anión superóxido ($\cdot O_2^-$), por ejemplo, es un radical; sin embargo, no puede difundirse a distancia debido a su limitada solubilidad en los lípidos y a su alta reactividad. El radical hidroxilo (OH^-) reacciona indiscriminadamente con cualquier estructura en su camino, por lo que carece de especificidad. El peróxido de hidrógeno, en cambio, es soluble en lípidos, se difunde

a través de las membranas lipídicas, tiene una vida más larga y parece ser más selectivo en sus reacciones con las moléculas biológicas [15]. Por lo tanto, como se espera tener reacciones de corta vida media pero de alta reactividad y capacidad de daño al material genético, las especies $\cdot O_2^-$, 1O_2 y OH^- son las más apropiadas para la aplicación.

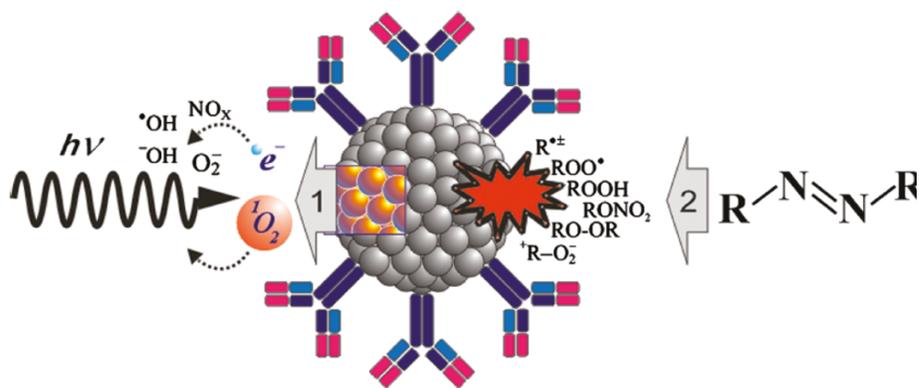


Figura 2.3: Mecanismo por el cual los puntos de carbono que exhiben una fluorescencia azul generan ROS.

Capítulo 3

Objetivo de la investigación

La literatura sugiere que los puntos de carbono presentan propiedades de fluorescencia en diferentes bandas de emisión desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, aquellos que presentan emisión en el azul son potencialmente oxidantes al ser irradiados. Este efecto oxidante, desempeña un papel fundamental en los procesos de muerte celular producto de la alta producción de ROS en la fototerapia. Fundamentalmente consiste en un tratamiento que utiliza luz de baja energía para destruir las células cancerosas donde los puntos de carbono pueden ser empleados como fotosensibilizadores, lo que significa que se pueden usar para absorber la luz y luego emitirla en una longitud de onda que sea dañina para las células generando moléculas oxidantes como las ROS.

Teniendo en cuenta este efecto esperado se plantea la pregunta de investigación.

3.1 Pregunta de investigación

¿Lo puntos de carbono sintetizados a partir de isoleucina y ácido cítrico tienen la capacidad de generar ROS al ser irradiados con una longitud de onda de 365nm?

3.2 Objetivos

3.2.1. General

Evaluar las propiedades fotodinámicas de una nanoplataforma basada en puntos de carbono como un potencial agente antitumoral.

3.2.2. Específicos

- Sintetizar puntos de carbono a partir de isoleucina y ácido cítrico (PC-IS@AC) por medio de una reacción asistida por microondas.
- Caracterizar las propiedades ópticas y superficiales de los PC-IS@AC.
- Determinar el efecto citotóxico de los PC-IS@AC en cultivos de células 3T3.
- Cuantificar la producción de ROS por los PC-IS@AC incubados en células 3T3 bajo irradiación de 365nm.

Capítulo 4

METODOLOGÍA

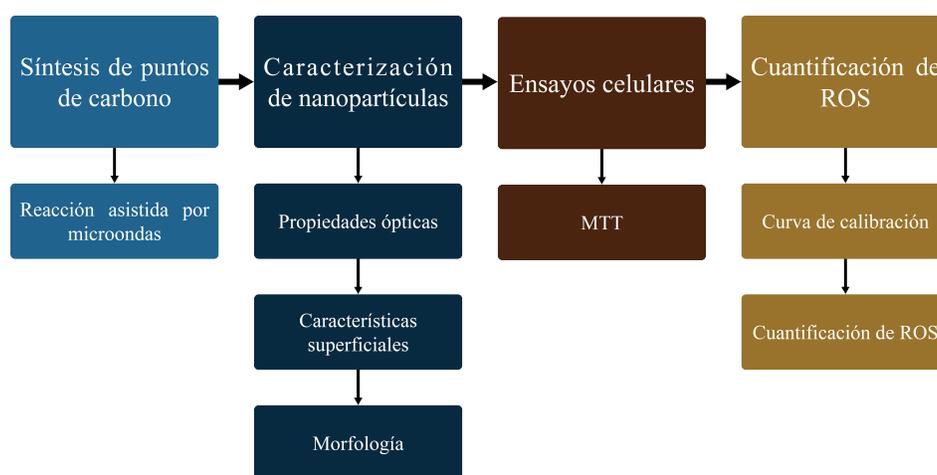


Figura 4.1: Diagrama de flujo para la metodología propuesta.

La figura 4.1 presenta el diagrama de flujo para el proyecto, allí se observan las tareas jerarquizadas en cuatro grandes grupos. En la primera etapa, se tiene la síntesis de puntos de carbono a partir de isoleucina y ácido cítrico por medio de una reacción asistida por microondas. Los PC-IS@AC representan la base para las tres etapas siguientes y deben ser sometidos a pruebas de caracterización, que entregan información acerca de sus propiedades ópticas y superficiales.

El ensayo MTT, evalúa la viabilidad para las células 3T3 que serán tratadas con PC-IS@AC dispersados en medio en función de la concentración de estos. Esto se utiliza como referencia para entender qué concentración de PC-IS@AC toleran las células sin perder su viabilidad metabólica. Por último, con los datos de la concentración máxima que presenta una viabilidad superior al 90% se empiezan las pruebas de irradiación y cuantificación de ROS, para lo que se debe contar con la curva de calibración de la sonda fluorescente de ROS. Una vez cumplido este requerimiento, se pueden cuantificar las ROS producidas por

la irradiación de 365nm en las células 3T3, con un parámetro de intensidad de fluorescencia estándar. Medir la producción de ROS de manera objetiva, facilita la comparación del efecto oxidante de la irradiación en los PC-IS@AC, porque, le permite contrastarse con la oxidación inducida por la hidrólisis generada al interior de las células a causa de la irradiación.

4.1 Síntesis de PC-IS@AC

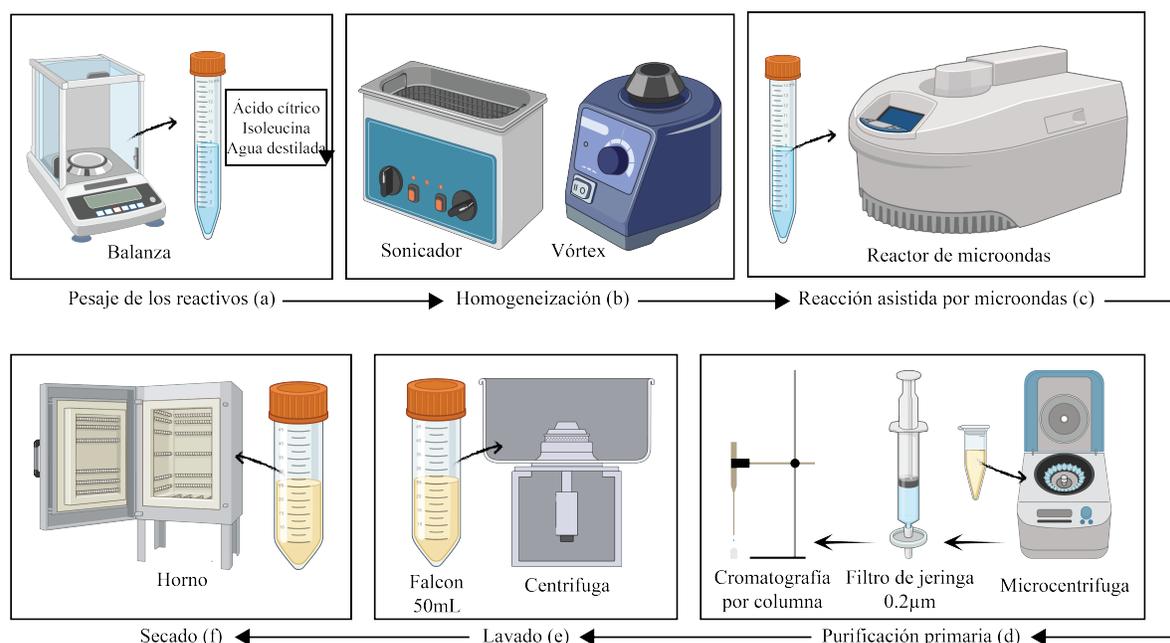


Figura 4.2: Síntesis de puntos de carbono, reacción asistida por microondas.

La síntesis de PC-IS@AC comprende tres etapas, reacción, purificación y secado. Para la reacción, se dispersan 250mg de ácido cítrico y 250mg de isoleucina como precursores de carbono, en, 6mL de agua destilada como solvente (figura 4.2, a). Esta mezcla se homogeneiza por medio sonicación y agitación vórtex (figura 4.2, b); una vez homogénea, se lleva al reactor de microondas MONOWAVE 50 (Anton Paar, Austria) durante 10 minutos a una temperatura de 195°C (figura 4.2, c) en la configuración *As Fast As Possible* (AFAP).

El resultante de la reacción (6 mL), se divide en 6 eppendorf y se somete a una purificación primaria por medio de centrifugación, filtrado y cromatografía por columna (figura 4.2, d). El proceso de centrifugación se realiza para remover los residuos insolubles y de alto peso molecular; el sobrenadante de la muestra centrifugada, se pasa por un filtro de jeringa de 0.20µm para remover partículas de bajo peso molecular que presenten un tamaño mayor al calibre del filtro. Finalmente la muestra se hace pasar por una columna de gel de sílice (aproximadamente 5cm con una pipeta Pasteur de 7mm de diámetro) como fase estacionaria, una solución (1:1) de N-N dimetilformamida y agua miliQ como eluyente, y la muestra como fase móvil.

Como purificación complementaria se realizan cuatro lavados, dos con etanol absoluto al 99 % (Scharlau) en relación 1.5:1 (volumen de muestra : volumen de etanol), y dos con acetona en relación 1.5:1 (volumen de muestra : volumen de acetona). Este proceso se lleva a cabo en 3 etapas, de primera mano se mezcla la muestra resultante de la cromatografía por columna con el etanol. Esta mezcla se agita vigorosamente durante aproximadamente cuatro minutos y se centrifuga 20 minutos a 20°C. El mismo proceso se repite con los tres lavados restantes y luego se introduce la muestra en el horno (UM100 Memmert, Países Bajos) a 100°C durante 4 horas. Una vez seca la muestra, se dispersan los PC-IS@AC en agua destilada filtrada, a una concentración de 10mg/mL.

4.2 Caracterización de los PC-IS@AC

Con el fin de determinar las propiedades ópticas de los PC-IS@AC, se emplea espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia. Las propiedades superficiales se miden por medio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

4.2.1. espectroscopia UV-Vis

Esta técnica consiste en irradiar los PC-IS@AC con longitudes de onda que van desde 230nm hasta 700nm, con pasos de 5nm entre medidas. Esta excitación genera transiciones electrónicas de bandas de menor energía, a bandas de mayor energía. Cuando se generan estas transiciones, la energía del haz de luz es absorbida por la muestra y de allí se obtiene el espectro de absorción. Los electrones que han sido excitados, deben volver a su estado estable para conservar la entropía del sistema. En esta transición, se generan fotones que son medidos y permiten construir el espectro de emisión [28].

La huella óptica de los PC-IS@AC se mide a partir de los espectros de absorción y fluorescencia obtenidos mediante el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES y el software OceanView. Los espectros son adquiridos a partir de una muestra con concentración de 5mg/mL a temperatura ambiente en una celda de cuarzo de 1cm de lado para un rango de 250nm hasta 800nm. Adicionalmente, se emplea el lector multimodal CytationTM3 (Biotek) y una placa para fluorescencia, para aislar el espectro de emisión de los puntos de carbono bajo irradiación de 365nm de excitación y un rango de emisión de 400nm a 700nm.

4.2.2. espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

FTIR utiliza el proceso matemático (transformada de Fourier) para traducir los datos sin procesar (interferograma) en el espectro real. Este, se utiliza para obtener el espectro infrarrojo de transmisión de los PC-IS@AC e identifica la presencia de grupos funcionales orgánicos e inorgánicos en la superficie de los PC-IS@AC [29]. Esta medida se realiza mediante el equipo NicoletTM(ThermoScientific) y el software OMNIC. Los resultados obtenidos se analizan por medio del software MATLAB.

4.3 Ensayo MTT

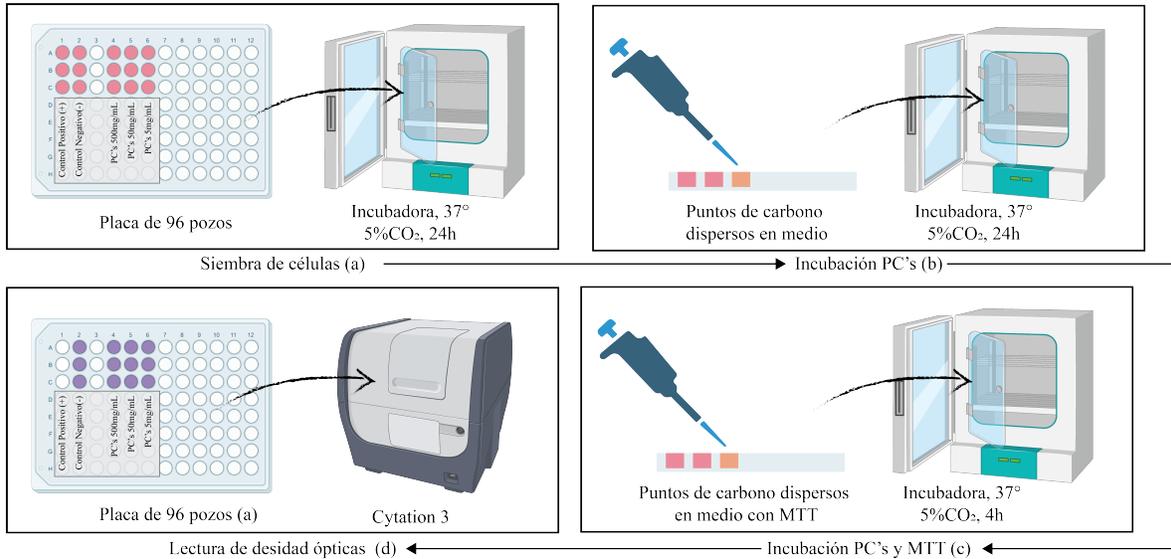


Figura 4.3: Procedimiento del ensayo MTT para células 3T3 con PC-IS@AC.

Para la siembra se emplean cultivos de células 3T3, que son fibroblastos embrionarios aislados del ratón. Los fibroblastos son el principal componente celular de los tejidos conectivos densos y son una línea celular típica utilizada para los estudios de citotoxicidad de los biomateriales [30].

Se utilizan cultivos celulares que tengan una confluencia mayor al 70 %. Se retira el medio y se realizan tres lavados con una solución balanceada en sales (PBS), que ayuda a mantener la integridad estructural y fisiológica de las células. Las células, que están adheridas al recipiente de cultivo, se remueven con ayuda de la solución de disociación celular Accutax y se cuentan, con el fin de tener una cantidad definida por pozo sembrado.

Para el conteo, en un hemocitómetro se colocan 10µL de la suspensión de células y 10µL de azul tripán. Luego, en el contador de células automatizado CytoSmart (Corning)TM se estima la cantidad de células vivas en relación al volumen y se calcula la cantidad de suspensión, para obtener aproximadamente diez mil células en cada pozo.

En el ensayo MTT se obtiene la viabilidad celular, midiendo la densidad óptica de la reducción de las sales de tetrazolio a formazán insoluble en la membrana de las células metabólicamente viables [31]. El formazán reducido se solubiliza en dimetilsulfóxido, generando una solución de coloración violeta (figura 4.4 que luego se mide en el lector multimodal CytationTM3 (Biotek) con 560nm de excitación y 670nm de emisión.

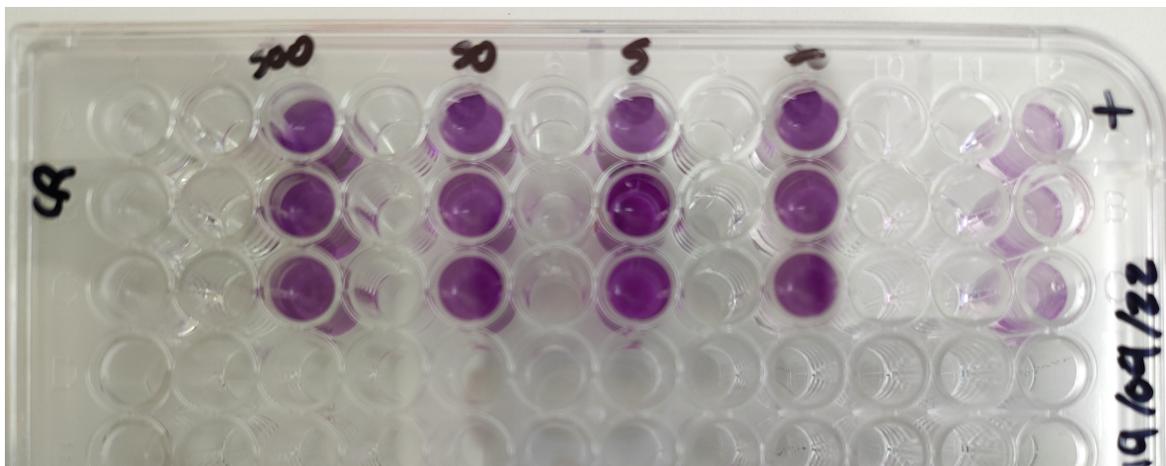


Figura 4.4: Caja de 96 pozos, prueba MTT en células 3T3 con PC-IS@AC a 500 μ g/mL, 50 μ g/mL y 5 μ g/mL.

Este ensayo se lleva a cabo en células 3T3 con tres tratamientos diferentes que consisten en PC-IS@AC dispersados en medio de cultivo completo, a concentraciones de 5 μ g/mL, 50 μ g/mL y 500 μ g/mL. Para esto, se siembran aproximadamente diez mil células por pozo, en una placa de 96 pozos (figura 4.3, a). Las células se incuban a 37°C en un ambiente de 5% de CO_2 durante 24 horas para garantizar la adherencia al fondo de la placa. Al culminar con el proceso de incubación, se cambia el medio de los pozos por los tratamientos con PC-IS@AC, se adiciona peróxido de hidrógeno al 70% al control positivo y se incuban nuevamente con los mismos parámetros del paso anterior (figura 4.3, b). Una vez cumplidas las 24 horas de la incubación, se adicionan 20 μ L de la solución MTT (5mg/mL dispersada en PBS) a los pozos con células, se coloca en una plancha de agitación a 150rpm por 5 minutos y se incuba por 4 horas a 37°C (figura 4.3, c). Para finalizar, se retira la solución de MTT, se diluyen los cristales de formazan reducidos por las células con 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se lee la densidad óptica con 560nm de excitación y 670nm de emisión (figura 4.3, d).

4.4 Especies reactivas de oxígeno

El principio de funcionamiento de la sonda fluorescente permeable a las células para la detección de ROS se muestra en la figura 4.5.

En resumen, el diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA) se difunde dentro de las células y es desacetilado por las esterasas celulares a 2', 7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH) no fluorescente, que se oxida rápidamente a 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) altamente fluorescente por las ROS (figura 4.5). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles de ROS en el citosol celular. La producción de ROS se cuantifica por medio del análisis en la intensidad para la fluorescencia de la sonda oxidada en función del estándar de DCF. Este parámetro se mide en una placa para fluorescencia en el lector multimodal Cytation™3 (Biotek) con 480nm de excitación y 530nm de emisión [32].

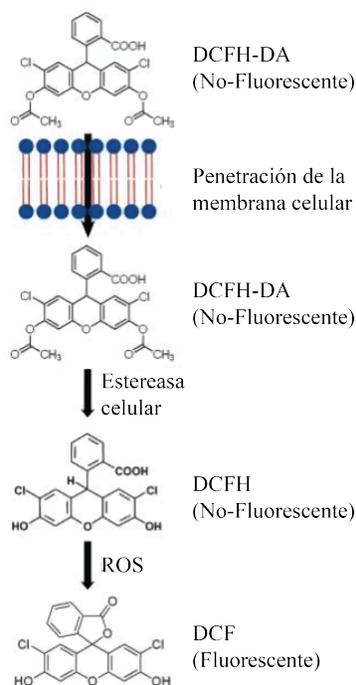


Figura 4.5: Principio de funcionamiento de la sonda fluorescente para la cuantificación de ROS.

4.4.1. Curva de calibración

Para la curva de calibración se sigue el protocolo propuesto por Cell Biolabs [32]. Este consiste en hacer una serie de diluciones del estándar de DCF 1:10 en el rango de $0\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$ como se observa en la tabla 4.1. Los datos se analizan con la ayuda del software MATLAB.

Tabla 4.1: Dilución en cascada, curva de calibración

Eppendorf	DCF estándar μL	Medio de Cultivo μL	DCF nM
1	10	990	10000
2	100 del eppendorf #1	900	1000
3	100 del eppendorf #2	900	100
4	100 del eppendorf #3	900	10
5	100 del eppendorf #4	900	1
6	100 del eppendorf #5	900	0.1
7	100 del eppendorf #6	900	0.01
8	0	1000	0

4.4.2. Incubación de PC-IS@AC

Tomando como referencia los resultados de viabilidad celular en el ensayo MTT, se elige el valor más alto de concentración de puntos de carbono que haya dado un porcentaje de

viabilidad mayor al 90 % en las células 3T3. Los PC-IS@AC se incuban por 24 horas a 37°C en un ambiente de 5% de CO_2 (figura 4.6 (b)), en células 3T3 previamente sembradas siguiendo el protocolo descrito al comienzo de este apartado. Para esto, se sigue el orden que se ilustra en la figura 4.6 (a) y se utilizan dos placas de 96 pozos, una que será irradiada y una que servirá de control. Cada placa tendrá células con PC-IS@AC, células sin PC-IS@AC, medio con PC-IS@AC y medio sin PC-IS@AC.

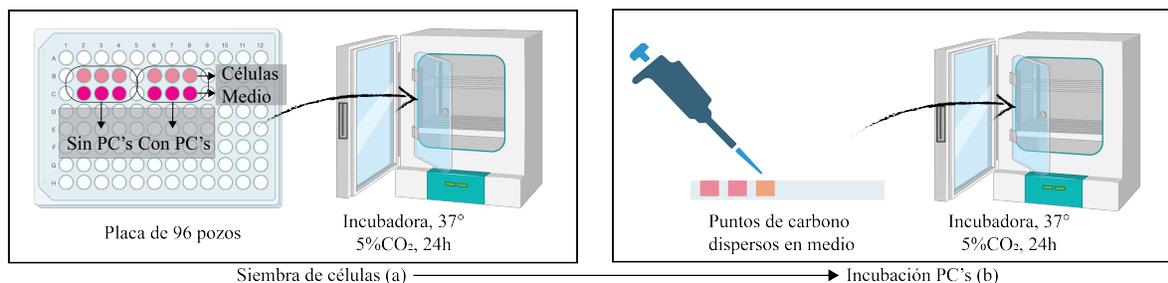


Figura 4.6: Incubación de PC-IS@AC

4.4.3. Irradiación y cuantificación de ROS

Utilizando el kit para detección de especies reactivas de oxígeno de OxiSelect™ (Cell Biolabs) se cuantifican las ROS generadas por los PC-IS@AC bajo irradiación de 365nm.

Después de incubar los PC-IS@AC, se realizan tres lavados con PBS en los pozos con células y se incuba la sonda de ROS por una hora (figura 4.7 (a)). Pasados los 60 minutos, se lava nuevamente con PBS y se expone la caja de irradiación durante 5 min con una longitud de onda de 365nm (figura 4.7 (b)). La intensidad de fluorescencia se mide en el lector multimodal Cytation™3 (Biotek) con 480nm de excitación y 530nm de emisión (figura 4.7 (c)). Los datos se cotejan con los resultados obtenidos de la curva de calibración y por medio de una regresión, se obtienen las concentraciones de ROS para cada condición experimental.

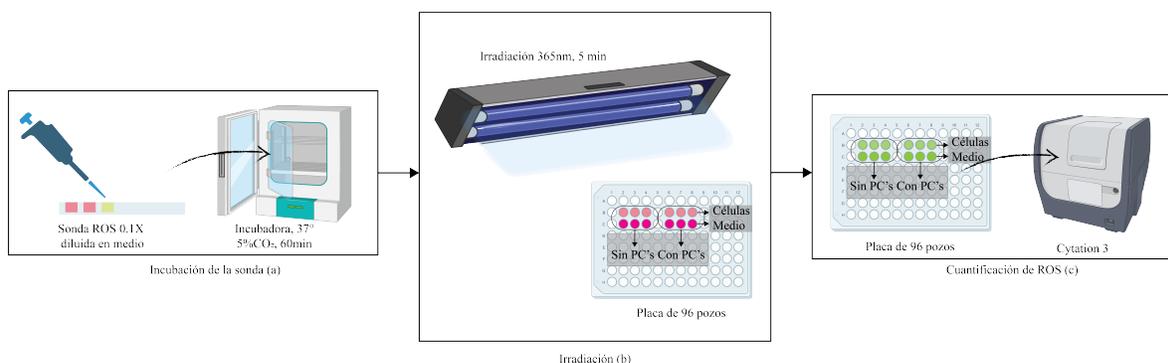


Figura 4.7: Incubación e irradiación de la sonda de ROS

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La emisión de los puntos de carbono dispersados en agua se observa en la figura 5.1. En este caso, a simple vista se puede apreciar una apariencia azulada bajo una irradiación de 365nm, y una apariencia semi-traslúcida con tonos amarillos bajo luz blanca. Los residuos generados por la reacción asistida por microondas, se removieron metódicamente siguiendo el proceso descrito en la sección 4.1.

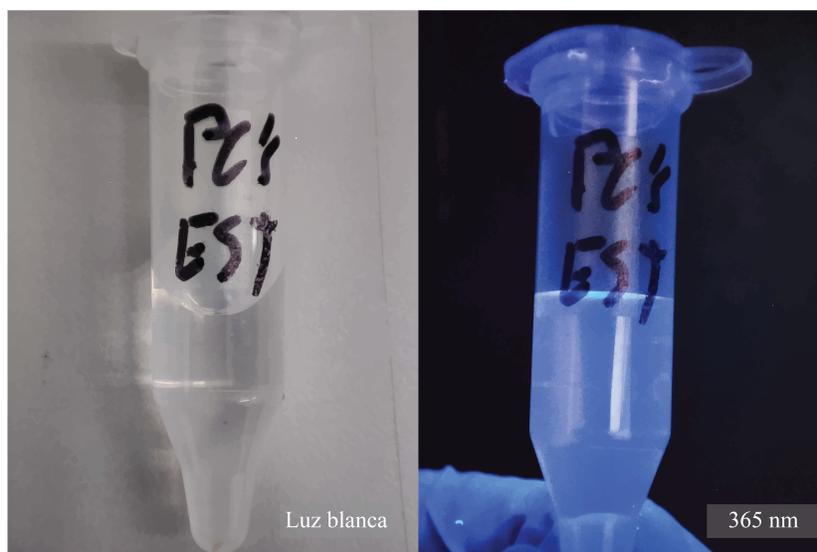


Figura 5.1: Emisión de PC-IS@AC en ausencia y bajo irradiación de luz de 365 nm.

5.1 Caracterización de puntos de carbono

Los puntos de carbono obtenidos a partir de isoleucina y ácido cítrico, exhiben una fluorescencia azul al ser excitados con una lámpara de 365nm. En la figura 5.3 se evidencia una emisión entre 400nm y 450nm en una muestra con concentración de 5mg/mL.

La isoleucina aportó a la fluorescencia en el azul, tomando como referencia la que ya es inherente al ácido cítrico y que ha sido reportada en la literatura. Los compuestos nitrogenados presentes en este aminoácido, representados por el grupo amino, pudieron contribuir

con la longitud de onda de emisión de los puntos de carbono empleados en este trabajo. Esto responde a lo reportado por Verselli *et al*, donde sugiere que los heteroátomos de nitrógeno contribuyen al espectro azulado cuando están embebidos en los puntos de carbono [14].

El espectro de absorción es de gran utilidad para entender el comportamiento de la fluorescencia en el material. Para los PC-IS@AC, se evidencia un máximo centrado entre 200nm y 300 nm (figura 5.2). En esta banda, se encuentran las longitudes de onda de mayor transición, que, para este caso en específico, se atribuyen a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ que atañe a los enlaces C=C. En este espectro, también se evidencia un pico entre 300nm y 400nm que puede asignarse a la absorción intrínseca de la transición $n \rightarrow \pi^*$. Estas longitudes de onda representan las transiciones electrónicas dadas por los enlaces C=O de los grupos carboxilo aportados por el ácido cítrico y la isoleucina. Tanto $\pi \rightarrow \pi^*$ como $n \rightarrow \pi^*$ son transiciones atribuidas al núcleo de los PC-IS@AC, lo que indica que la superficie debe ser caracterizada por un método diferente.

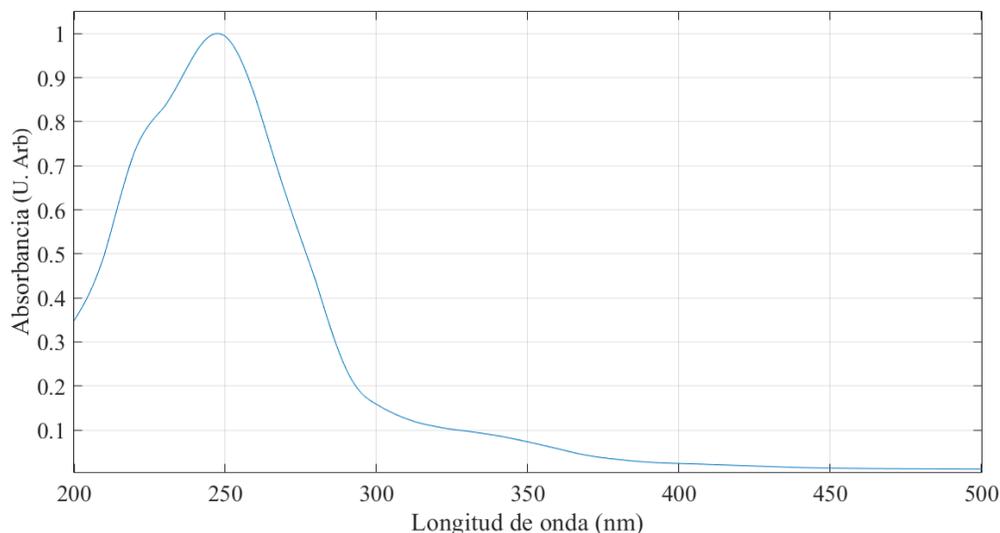


Figura 5.2: Espectro de absorción para los puntos de carbono.

La emisión en el azul representa transiciones electrónicas de mayor energía en comparación con longitudes de onda mayores como el rojo y el infrarrojo [2]. Por esta razón, los puntos de carbono obtenidos en esta síntesis cumplen las condiciones ópticas para la producción del ROS y su huella óptica es similar a la reportada por Christensen *et al* en su aplicación de puntos de carbono como agentes oxidantes.

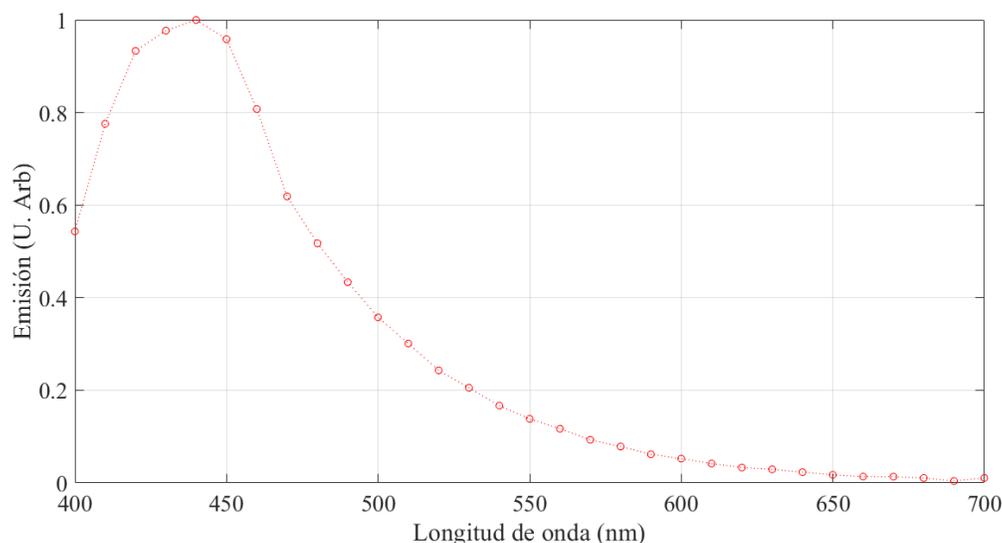


Figura 5.3: Espectro de emisión, PC's irradiados con 365nm.

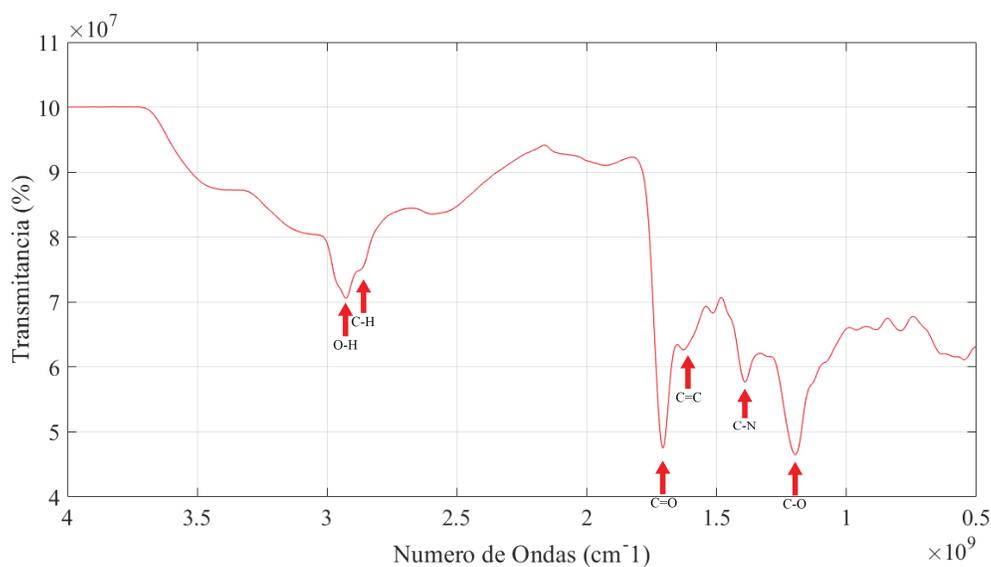


Figura 5.4: FTIR, puntos de carbono sintetizados con isoleucina y ácido cítrico

La caracterización superficial por medio de FTIR de una muestra seca de PC-IS@AC de aproximadamente 10mg, se presenta en la figura 5.4. En esta gráfica se observan las hibridaciones características en los PC's sp^2 y sp^3 , atribuidas a los enlaces C=C y C-O. Los enlaces dobles, C=C y C=O, se pueden apreciar entre los 2000cm^{-1} y los 1500cm^{-1} ; las interacciones simples, C-O y C-N, están presentes entre los 1500cm^{-1} y 1000cm^{-1} . Asimismo, los enlaces O-H y C-H se observan entre los 4000cm^{-1} y los 2500cm^{-1} y la presencia de amidas se ve entre los 1700cm^{-1} y los 1500cm^{-1} . Esta información, nos indica que el ácido cítrico y la isoleucina representan un aporte mayoritario de átomos de C, H, O, N y que, además, se han

producido puntos de carbono con diferentes grupos funcionales que tienen relación directa con la fluorescencia [14].

5.2 Ensayo MTT

El ensayo de MTT se llevó a cabo en células 3T3 tratadas por 24 horas con PC-IS@AC a 37°C con un 5% de CO_2 . En este se obtiene la viabilidad celular, midiendo la densidad óptica de la reducción de las sales de tetrazolio a formazán insoluble en la membrana de las células metabólicamente viables [31].

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Absorbancia de las células tratadas}}{\text{Absorbancia de las células de control}} * 100 \quad (5.1)$$

En la figura 5.5 se evidencia la viabilidad celular para los tratamientos de PC-IS@AC dispersados en medio de cultivo completo, a concentraciones de 5µg/mL, 50µg/mL y 500µg/mL en muestras triplicadas. La altura de las barras indica el porcentaje de viabilidad frente al control, que no ha sido tratado con las nanopartículas y que supone una viabilidad del 100% (Eq.5.1). Allí, se puede apreciar que los PC-IS@AC presentan una baja citotoxicidad en las tres concentraciones propuestas con una desviación estándar máxima de 20%.

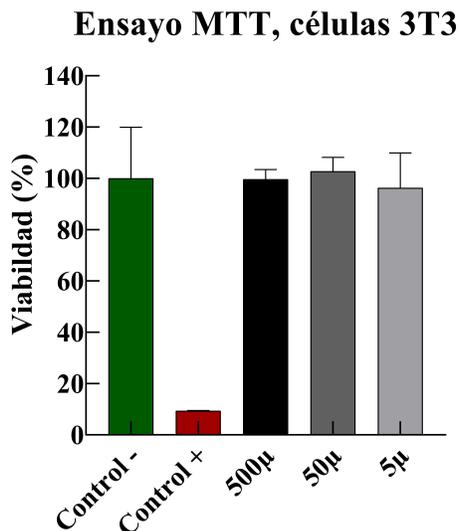


Figura 5.5: Viabilidad MTT para células 3T3 tratadas con PC-IS@AC a concentraciones de 5µL/mL, 50µL/mL y 500µL/mL.

El análisis estadístico de los datos se realizó con la herramienta PRISM ®8 (GraphPad, San Diego). Los resultados de viabilidad para las tres concentraciones anteriormente mencionadas presentan una distribución normal y una varianza homogénea entre los grupos (Tabla 5.1). Estas condiciones son necesarias para la prueba ANOVA de un factor [33], en donde se presenta como hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencias significativas entre las medias de los grupos.

Tabla 5.1: Análisis de normalidad y homocedasticidad de los datos de absorbancia para el ensayo MTT en células 3T3 tratadas con PC-IS@AC

Prueba Shapiro-Wilk	Control	500µg/mL	50µg/mL	5µg/mL
W	0.9684	0.8286	0.8013	0.9920
Valor P	0.8651	0.1849	0.1176	0.8295
¿Pasa la prueba de normalidad?	Sí	Sí	Sí	Sí
Prueba Brown-Forsythe				
F (DFn, DFd)	2.197 (3, 10)			
Valor P	0.1514			
¿Hay diferencias significativas en la DE (P <0.05)?	No			

Una vez comprobada la normalidad y la homocedasticidad en los datos, se hace un análisis de varianza de un solo factor ANOVA. El valor de significancia es de 0.69 como se observa en la tabla 5.2. Esto indica que no se debe rechazar la hipótesis nula [33], es decir, no hay diferencias significativas entre las medias de los tres grupos de concentración. Con esta información y teniendo en cuenta los resultados de viabilidad celular para el ensayo MTT, se infiere que es apropiado utilizar la concentración de PC-IS@AC de 500µg/mL porque mostró ser no citotóxica para las células 3T3 y no exhibe una diferencia significativa de viabilidad, frente a las concentraciones de 50µg/mL y 5µg/mL. Una mayor concentración de PC-IS@AC implica una mayor intensidad de fluorescencia [2], lo que facilita el seguimiento del efecto de sobrelapamiento en la emisión de los PC-IS@AC y la sonda fluorescente de ROS. Además, siguiendo el postulado de Christensen *et al*, donde cada punto de carbono es capaz de producir ROS [5], tener una mayor cantidad de PC-IS@AC, aumenta la probabilidad de generar alguna de las especies reactivas de oxígeno y por ende, la probabilidad de generar daño celular.

Tabla 5.2: Análisis de Varianza de un factor (prueba ANOVA) para el ensayo MTT en células 3T3 tratadas con PC-IS@AC.

ANOVA de un factor	
F	0.3950
Valor P	0.6900
¿Existe una diferencia significativa entre las medias?	No
R cuadrado	0.1163

5.3 Cuantificación de ROS

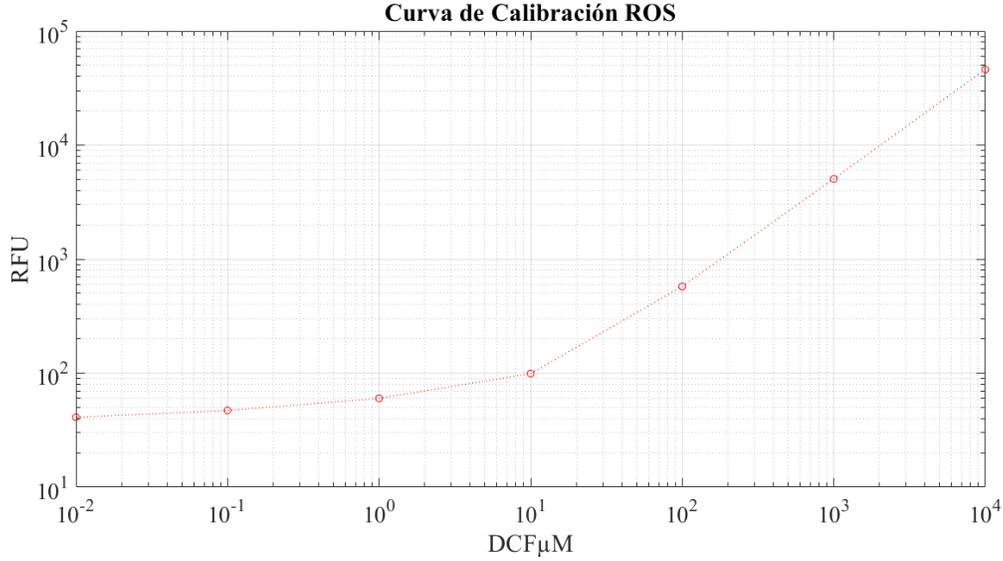


Figura 5.6: Curva de calibración de ROS presentada en escala logarítmica construida con los parámetros expuestos en la sección 4.4.1, DCF estándar diluido en medio de cultivo incompleto.

En la figura 5.6 se observan los resultados de la curva de calibración para la sonda fluorescente de ROS con el componente estándar (DCF estándar). Esta gráfica exhibe un comportamiento suave y derivable en todo su dominio, además, el rango en el que está definida es finito e invariante en el tiempo. Con estas características se puede reconstruir una ecuación que describa el comportamiento de la concentración (μM) en función de la intensidad de la fluorescencia (RFU). Utilizando la función polyfit en MATLAB, se extrae la ecuación que mejor se ajusta a la curva descrita por los puntos marcados en la figura 5.6. Después de testear ajustes con polinomios de diferentes grados, se obtiene la ecuación 5.2 que presenta un ajuste del 95 % con los datos.

$$\text{Concentración}(\mu\text{M}) = -4,65 \cdot 10^{-11} RFU^3 + 2,81 \cdot 10^{-6} RFU^2 + 0,18 RFU - 8,35 \quad (5.2)$$

La tabla 5.3 muestra los valores de intensidad de fluorescencia promedio obtenidos para las ocho condiciones experimentales descritas en 4.4.2. Allí, mediante la función polyval de Matlab y la ecuación 5.2 se estiman los valores de concentración para cada caso.

Tabla 5.3: Resultados de la regresión para hallar los valores de concentración tomando como base la intensidad de la fluorescencia.

*Concentración		Con PC-IS@AC		Sin PC-IS@AC	
		Concentración (μM)	RFU	Concentración (μM)	RFU
Caja irradiada	Células	129.849	733.7	125.1	708.7
	Medio	4864	21622	5591	24642
Caja no irradiada	Células	85.97	502.3	95.88	554.7
	Medio	312.4	1674	283.1	1524

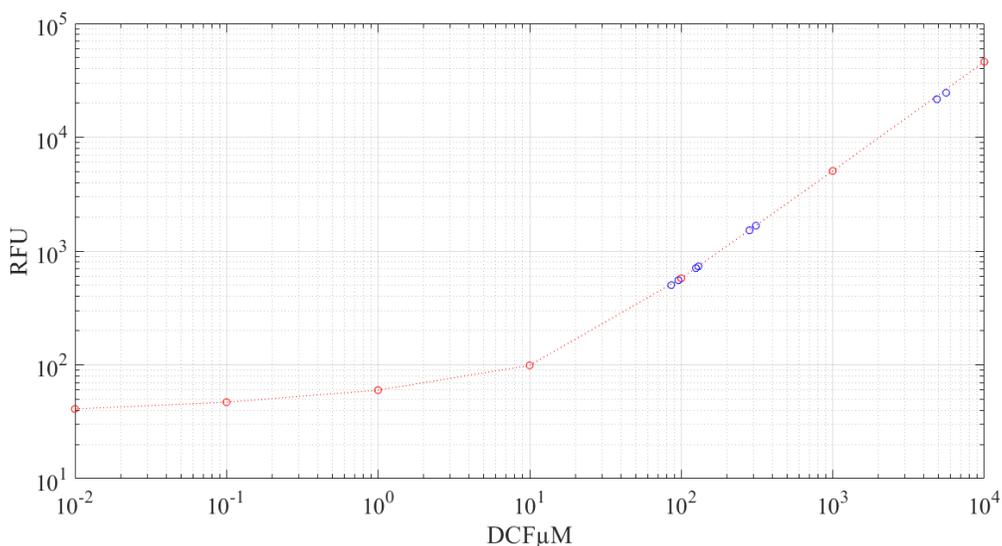


Figura 5.7: Resultados para la intensidad de fluorescencia (tabla 5.3) comparados con la curva de calibración de ROS (tabla 4.1).

En la figura 5.7 se evidencia que los valores calculados para la concentración de ROS en las muestras se encuentran bajo la curva de calibración, es decir que, los resultados obtenidos pueden emplearse para el análisis estadístico con un valor de confianza del 95 %, que corresponde al porcentaje de ajuste de la ecuación 5.2 con los datos de la calibración.

Para estimar el efecto de la fluorescencia de los puntos de carbono en la longitud de onda que requiere la emisión en la prueba de ROS, se ha medido también la fluorescencia de los PC-IS@AC dispersados en medio de cultivo incompleto como se observa en la figura 5.8. Estos datos tienen distribución normal y presentan diferencias significativas con respecto a la media de las células irradiadas. Asimismo, en la figura 5.8 también se evidencia que los valores de emisión de solamente los PC-IS@AC dispersados en medio y excitados con 430nm, no es tan significativo en comparación a las medias de cualquiera de las condiciones experimentales propuestas.

Tabla 5.4: Resultados de la prueba T para para la concentración de ROS en las muestras irradiadas de células 3T3 con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.

Prueba t para muestras no pareadas	
Valor P	0.7862
¿Significantemente diferente? ($P < 0.07$)	No
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=0.2900, df=4

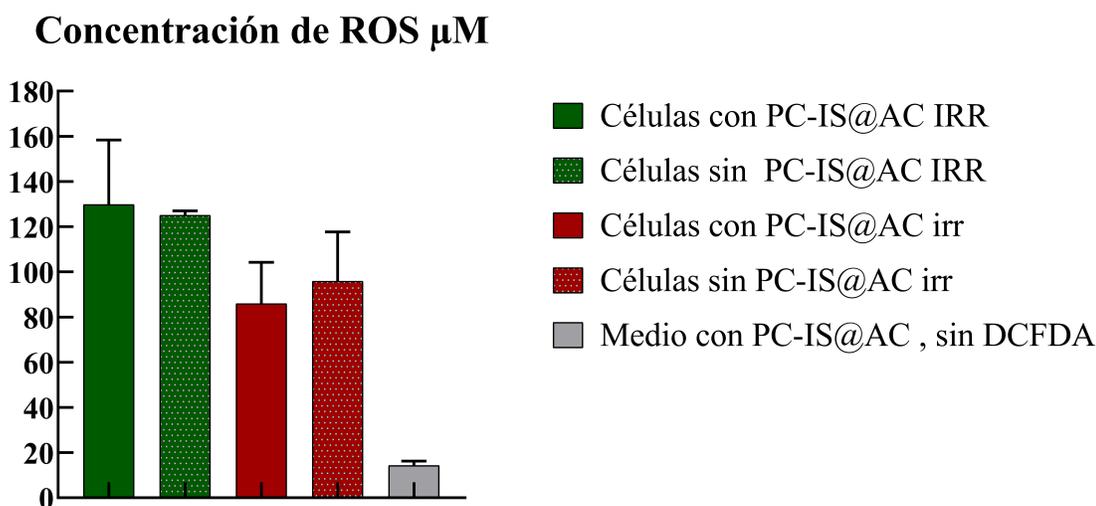


Figura 5.8: Concentración de ROS en células 3T3 irradiadas con 365nm y no irradiadas, tratadas con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC. (IRR: irradiado, irr: sin irradiar).

En aras de dar respuesta a la pregunta de investigación planteada en 3.1, se emplea una prueba T en donde se comparan las medias de las concentraciones de ROS en las células 3T3 para la caja irradiada con 365nm. En este análisis, también se debe probar la normalidad en la distribución de los datos. Para esto, se realiza una prueba Shapiro-Wilk, que presenta valores P de significancia para las células irradiadas con PC-IS@AC y las células irradiadas sin PC-IS@AC de 0.6133 y 0.7389 respectivamente, comprobando que las muestras sí cumplen con una distribución normal.

La H_0 de la prueba T, al igual que la ANOVA de un factor, es que no existen diferencias significativas entre las medias de los grupos. No obstante, para este caso no se debe hacer una prueba ANOVA por la cantidad de muestras agrupadas, ya que, n debe ser mayor a 2 y para este análisis $n = 2$ [33]. Con la distribución normal, se asume una distribución Gaussiana en donde se emplea una prueba T paramétrica para muestras no pareadas. Los resultados de este análisis se evidencian en la tabla 5.4.

ROS generadas en las células 3T3 con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC

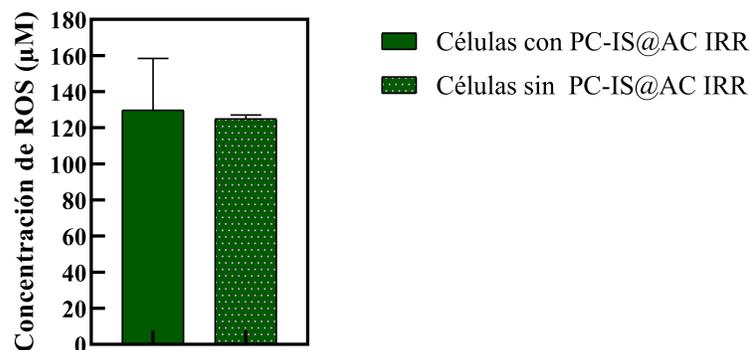


Figura 5.9: Concentración de ROS en células 3T3 irradiadas con 365nm tratadas con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.

La figura 5.9 presenta los valores de concentración de ROS en células 3T3 irradiadas tratadas con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC. En esta gráfica es evidente la similitud en las medias de los dos grupos, además, para el análisis T, el valor de significancia P sugiere que no existen diferencias en la producción de ROS para las células tratadas con PC-IS@AC en relación con las que estaban solamente en medio de cultivo. Con base en estos resultados, se infiere que los PC-IS@AC no exhiben propiedades oxidantes y no podrían ser empleados como agente fotodinámico. No obstante, valdría la pena medir la oxidación de los PC-IS@AC con diferentes dosis de irradiación para poderles descartar definitivamente.

Concentración de ROS µM

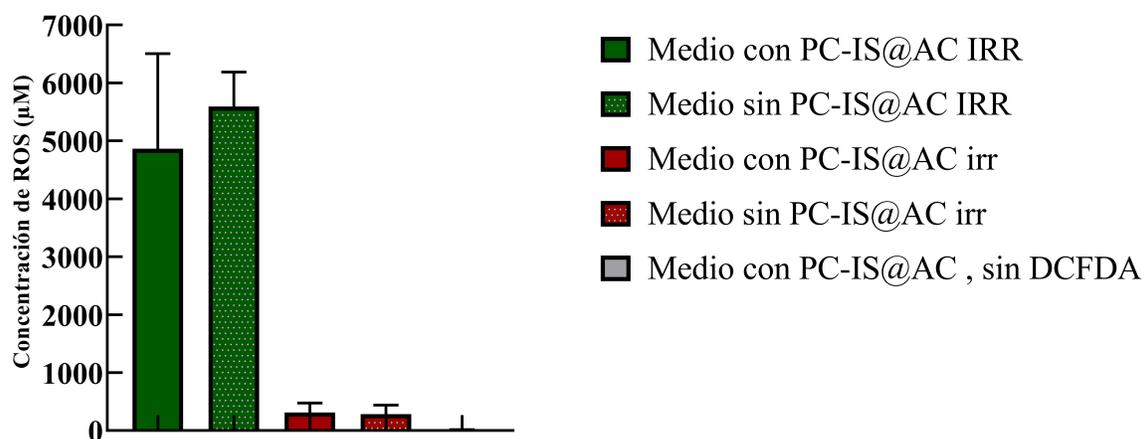


Figura 5.10: Concentración de ROS en medio incompleto irradiado con 365nm y sin irradiar, tratado con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.

Analizando los resultados para la producción de ROS por el medio de cultivo incompleto, se

tiene la figura 5.10. Allí se ve una diferencia considerable entre la caja irradiada en comparación con la caja no irradiada. Es decir, a simple vista, en el medio hubo una producción de ROS bastante marcada, aún en comparación con las células.

Tabla 5.5: Análisis de Varianza de un factor (prueba ANOVA) para la producción de ROS en medio con PC-IS@AC y sin PC-IS@AC.

ANOVA de un factor	
F	31.53
Valor P	0.0001
¿Existe una diferencia significativa entre las medias?	Sí
R cuadrado	0.9221

Esta inferencia se corrobora observando la tabla de la prueba ANOVA que compara las medias en la producción de ROS por las muestras que no contenían células. El valor P de significancia es muy pequeño como se observa en la tabla 5.5, lo que quiere decir que sí se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Esto puede explicar en parte el resultados obtenidos en el análisis anterior para las células. En el medio, no se retiró el fluoróforo sobrante como sí se hizo en las células, además, en este montaje experimental no se tuvo un control sobre la cantidad de nanopartículas que consiguieron permear la membrana de las células. Estos dos supuestos pueden representar varios inconvenientes a la hora de tener un control objetivo sobre los resultados.

No saber cuantos PC-IS@AC quedaron finalmente en el interior de las células es contra-productivo, dado que, pudieron quedar pocas nanopartículas que no representen un aporte significativo a la producción de ROS. Por otra parte, la cantidad de fluoróforo presente en los pocillos con células pudo ser mucho menor en comparación al que quedó en el medio. Las células tuvieron solamente 60 minutos para que la sonda de ROS pudiera difundirse a través de la membrana, pasado este tiempo, el sobrante del pozo fue reemplazado por medio de cultivo. En los pocillos que contenían medio, la sonda de ROS quedó con su concentración original, es decir, no se removieron excesos de sonda porque no tiene sentido retirarla, ya que no tiene cómo quedar incubada en alguna célula o en algún mecanismo de almacenamiento.

Otro factor a tener en cuenta es la línea celular empleada. Las células 3T3 podrían poseer un sistema antioxidante robusto. Por esta razón, valdría la pena probar este mismo montaje experimental en diferentes líneas celulares como, por ejemplo, líneas tumorales o de diferentes tejidos. Con este análisis se tendría una variable de gran impacto para conocer el mecanismo de generación de ROS con diferentes condiciones metabólicas.

En este montaje experimental se tuvo una lámpara de 365nm con 8W de potencia, a una distancia aproximada de la superficie de la caja de 96 pocillos de 20cm. La potencia de la lámpara va decreciendo a medida que aumenta la distancia con su objetivo, este efecto se explica por la manera en a que esta distribuye la luz. El foco de la lámpara no es coherente, lo que quiere decir que la intensidad de la irradiación no se centra en un área específica sino que

se extiende por un espacio definido por la apertura de irradiación. En este caso, otro de los factores que pudo haber afectado la irradiación de manera significativa se ilustra en la figura 5.11.

Si la luz no alcanza la base de cultivo de manera directa, como lo es el caso de la figura 5.11, la dosis de irradiación dependerá de la opacidad de la caja de cultivo, dado que las células se encuentran adheridas en su mayoría al fondo del pocillo, que tiene un área aproximada de 34mm^2 . Bajo este supuesto, tomando en cuenta la distancia de irradiación y la potencia de la lámpara, tener un factor de atenuación puede tener un impacto considerablemente negativo sobre la eficiencia en la irradiación, pese a que la caja de cultivo es transparente y está hecha con poliestireno de baja opacidad.

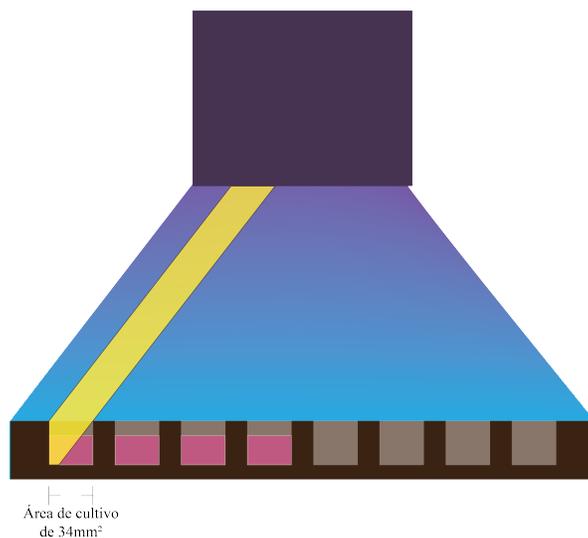


Figura 5.11: Lámpara UV con un foco no coherente irradiando una caja de 96 pocillos.

Esta variable puede mantenerse controlada si se dispone de una fuente de 365nm con un foco coherente. También podría considerarse aumentar la densidad de potencia en la irradiación con una lámpara de mayor intensidad o reduciendo la distancia que hay entre la lámpara y la caja de cultivo.

Capítulo 6

Conclusiones

Las pruebas de caracterización óptica y superficial demostraron que la síntesis asistida por microondas a partir de isoleucina y ácido cítrico promovió la formación de puntos de carbono fluorescentes. Estos exhibieron un buen rendimiento de fluorescencia y pocos residuos. Asimismo, el espectro de emisión con una excitación de 365nm mostró una emisión en el azul que se vio favorecida por los compuestos nitrogenados presentes en la isoleucina y los grupos funcionales que se observaron en la prueba de FTIR. Los espectros de absorción y emisión se mantuvieron invariantes en el tiempo, lo que indica la estabilidad química y de fluorescencia de los puntos de carbono sintetizados por PC-M.

Los PC-IS@AC no exhibieron citotoxicidad en cultivos de células 3T3 a ninguna de las concentraciones propuestas. La interacción de los PC-IS@AC no afectó el comportamiento metabólico de las células 3T3. Las concentraciones de PC-IS@AC no exhibieron diferencias significativas entre sus medias, lo que indica que hasta 500µg/mL no se exhibe una reducción de la viabilidad metabólica en las células 3T3. Los resultados de varianza y normalidad, indican que los datos se distribuyen de forma Gaussiana y que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los grupos, lo que sugiere condiciones homogéneas para cada condición experimental en sus muestras triplicadas.

Los PC-IS@AC no exhibieron propiedades fotodinámicas con la excitación de 365nm. No se evidenciaron diferencias significativas entre las medias de producción de ROS para las células 3T3 incubadas con PC-IS@AC y para las células 3T3 en solo medio de cultivo. Pese a las buenas propiedades ópticas de los PC-IS@AC su efecto no representa una diferencia en la oxidación de la sonda fluorescente de ROS en ninguna de las condiciones experimentales. La curva de calibración para la sonda fluorescente de ROS tuvo buenos resultados de estimación en su concentración para las ocho condiciones experimentales propuestas. Se consiguió cuantificar las ROS producidas en las células 3T3 incubadas con PC-IS@AC.

Capítulo 7

RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

7.1 Recomendaciones

En aras de complementar el estudio de biocompatibilidad de los PC-IS@AC, es apropiado realizar ensayos en diferentes líneas celulares. Además, el estudio de generación de ROS por los PC-IS@AC, debe realizarse con irradiaciones que le otorguen potencias de excitación variables a las muestras para concluir que este material definitivamente no es apropiado para la aplicación. Asimismo, valdría la pena explorar otras longitudes de onda de excitación y también puntos de carbono diferentes a los sintetizados en este trabajo.

7.2 Trabajos futuros

A corto plazo se ha planteado evaluar la biocompatibilidad de los PC-IS@AC en líneas celulares diferentes a las 3T3 para su aplicación en áreas relacionadas con la investigación biomédica. Además, valdría la pena modificar el montaje experimental propuesto teniendo en cuenta la distancia de irradiación, la densidad de potencia entregada a cada pocillo y encontrando un mecanismo de cuantificación de nanopartículas en el interior de las células, para que en un mediano y largo plazo, se pueda continuar con la idea de la nanoplataforma basada en puntos de carbono como un potencial agente antitumoral.

Bibliografía

- [1] A. A. Yetisgin, S. Cetinel, M. Zuvin, A. Kosar, and O. Kutlu, “Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications,” *Molecules*, vol. 25, no. 9, p. 2193, 2020.
- [2] M. Liu, “Optical properties of carbon dots: a review,” *Nanoarchitectonics*, pp. 1–12, 2020.
- [3] S. Y. Lim, W. Shen, and Z. Gao, “Carbon quantum dots and their applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, pp. 362–381, 2015.
- [4] P. Namdari, B. Negahdari, and A. Eatemadi, “Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 87, pp. 209–222, 3 2017.
- [5] I. L. Christensen, Y. P. Sun, and P. Juzenas, “Carbon dots as antioxidants and prooxidants,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 7, pp. 667–676, 10 2011.
- [6] F. Salehi, F. Daneshvar, M. Karimi, R. D. Vais, M. A. Mosleh-Shirazi, and N. Sattarahmady, “Enhanced melanoma cell-killing by combined phototherapy/radiotherapy using a mesoporous platinum nanostructure,” *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, vol. 28, pp. 300–300–307, 2019.
- [7] H. L. H. Ph.D., C. R. M. Ph.D., J. J. C. Ph.D., and R. A. Ph.D., “Cancer.,” *Magill’s Medical Guide (Online Edition)*, 2021.
- [8] T. Liu, Y. Song, Z. Huang, X. Pu, Y. Wang, G. Yin, L. Gou, J. Weng, and X. Meng, “Photothermal photodynamic therapy and enhanced radiotherapy of targeting copolymer-coated liquid metal nanoparticles on liver cancer,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 207, p. 112023, 2021.
- [9] Y. P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. Fernando, P. Pathak, M. J. Mezziani, B. A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P. G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. Chen, L. M. Veca, and S. Y. Xie, “Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 7756–7757, 6 2006.
- [10] N. Vasimalai, V. Vilas-Boas, J. Gallo, M. de Fátima Cerqueira, M. Menéndez-Miranda, J. M. Costa-Fernández, L. Diéguez, B. Espiña, and M. T. Fernández-Argüelles, “Green synthesis of fluorescent carbon dots from spices for in vitro imaging and tumour cell growth inhibition,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 9, pp. 530–544, 2 2018. Item Citation: Beilstein Journal of Nanotechnology, Vol 9,

Iss 1, Pp 530-544 (2018)

Related Material: <https://doaj.org/toc/2190-4286>

Accession Number: edsdoj.1aa4fcfa8c73402397b1f3205eb0a3c5; Publication Type: Academic Journal; Source: Beilstein Journal of Nanotechnology; Language: English; Format: electronic resource; Publication Date: 20180201; Imprint: Beilstein-Institut, 2018.

- [11] A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. M. Farkhani, N. Zarghami, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, and S. Davaran, "Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity," *Nanoscale research letters*, vol. 7, p. 480, 8 2012.
- [12] H. Hou, Z. Wang, Y. Ma, K. Yu, J. Zhao, H. Lin, and F. Qu, "Nir-driven intracellular photocatalytic oxygen-supply on metallic molybdenum carbide@n-carbon for hypoxic tumor therapy," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 607, pp. 1–15, 2022.
- [13] A. Khayal, V. Dawane, M. A. Amin, V. Tirth, V. K. Yadav, A. Algahtani, S. H. Khan, S. Islam, K. K. Yadav, and B. H. Jeon, "Advances in the methods for the synthesis of carbon dots and their emerging applications," *Polymers*, vol. 13, 9 2021.
- [14] B. Vercelli, R. Donnini, F. Ghezzi, A. Sansonetti, U. Giovanella, and B. La Ferla, "Nitrogen-doped carbon quantum dots obtained hydrothermally from citric acid and urea: The role of the specific nitrogen centers in their electrochemical and optical responses," *Electrochimica Acta*, vol. 387, p. 138557, 2021.
- [15] W. . . . Zhang and P. . . . Huang, *ROS*, vol. 2-2. Springer New York, 1 2017. Accession Number: edseld.2-52.0-85038958684; (Cancer Therapeutic Targets, 1 January 2017, 2-2:935-944) Publication Type: Book; Rights: Copyright 2017 Elsevier B.V., All rights reserved.
- [16] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C. H. A. Tsang, X. Yang, and S.-T. Lee, "Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 26, pp. 4430–4434, 2010.
- [17] H. Ming, Z. Ma, Y. Liu, K. Pan, H. Yu, F. Wang, and Z. Kang, "Large scale electrochemical synthesis of high quality carbon nanodots and their photocatalytic property," *Dalton Trans.*, vol. 41, pp. 9526–9531, 2012.
- [18] A. Alaghmandfard, O. Sedighi, N. T. Rezaei, A. A. Abedini, A. M. Khachatourian, M. S. Toprak, and A. Seifalian, "Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 120, p. 111756, 2021.
- [19] Y. Wang and A. Hu, "Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 2, no. 34, pp. 6921–6939, 2014.
- [20] H. Pang, X. Cao, L. Zhu, and M. Zheng, *Synthesis of Functional Nanomaterials for Electrochemical Energy Storage*. Springer, 2020.
- [21] H. M. Ng, G. Lim, and C. Leo, "Comparison between hydrothermal and microwave-assisted synthesis of carbon dots from biowaste and chemical for heavy metal detection: A review," *Microchemical Journal*, vol. 165, p. 106116, 2021.

- [22] D. Michael P áMingos *et al.*, “Tilden lecture. applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry,” *Chemical society reviews*, vol. 20, no. 1, pp. 1–47, 1991.
- [23] DAIREM, “Nuestras tecnologías de calentamiento y secado para alimentación e industria - sairem.”
- [24] M. R. Rosana, J. Hunt, A. Ferrari, T. A. Southworth, Y. Tao, A. E. Stiegman, and G. B. Dudley, “Microwave-specific acceleration of a friedel–crafts reaction: Evidence for selective heating in homogeneous solution,” *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 79, pp. 7437–7450, 8 2014. doi: 10.1021/jo501153r.
- [25] A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, M. Abasi, Y. Hanifehpour, and S. W. Joo, “Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications,” *Nanoscale research letters*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 2014.
- [26] W. H. Organization, “Cancer,” 9 2021.
- [27] G. Getachew, C. Korupalli, A. S. Rasal, and J.-Y. Chang, “Ros generation/scavenging modulation of carbon dots as phototherapeutic candidates and peroxidase mimetics to integrate with polydopamine nanoparticles/gox towards cooperative cancer therapy,” *Composites Part B: Engineering*, vol. 226, p. 109364, 2021.
- [28] K. Torres-Rivero, J. Bastos-Arrieta, N. Fiol, and A. Florido, “Chapter ten - metal and metal oxide nanoparticles: An integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges,” in *Biosynthesized Nanomaterials* (S. K. Verma and A. K. Das, eds.), vol. 94 of *Comprehensive Analytical Chemistry*, pp. 433–469, Elsevier, 2021.
- [29] X. Hou, S. Lv, Z. Chen, and F. Xiao, “Applications of fourier transform infrared spectroscopy technologies on asphalt materials,” *Measurement*, vol. 121, pp. 304–316, 2018.
- [30] S. K. Bhatia and A. B. Yetter, “Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements,” *Cell Biology and Toxicology*, vol. 24, pp. 315–319, 8 2008.
- [31] S. D. Mahajan, W.-C. Law, R. Aalinkeel, J. Reynolds, B. B. Nair, K.-T. Yong, I. Roy, P. N. Prasad, and S. A. Schwartz, “Chapter three - nanoparticle-mediated targeted delivery of antiretrovirals to the brain,” in *Nanomedicine* (N. Düzgüneş, ed.), vol. 509 of *Methods in Enzymology*, pp. 41–60, Academic Press, 2012.
- [32] C. Biolabs, “Sta-347-in-vitro-ros-rns-assay-kit,”
- [33] H. Motulsky, “Graphpad prism 9 statistics guide - one-way anova,” 2022.