

CONGRESO CASERB

LIBRO DE ACTAS

XXXVIII Congreso
Anual de la
Sociedad Española
de Ingeniería Biomédica

ORGANIZADORES Y COLABORADORES:



GRUPO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



BioRes
BIOENGINEERING
AND RESUSCITATION

Sociedad Española de
INGENIERÍA BIOMÉDICA





LIBRO DE ACTAS

25 - 27 de noviembre de 2020

XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica CASEIB 2020

Los contenidos de esta publicación han sido evaluados por el Comité Científico que en ella se relaciona y según el procedimiento que se recoge en www.caseib.es/2020/

Presidente del Comité Organizador:

Roberto Hornero Sánchez

Secretario del Comité Organizador:

Jesús Poza Crespo

Editores:

Roberto Hornero Sánchez

Jesús Poza Crespo

Carlos Gómez Peña

María García Gadañón

Maquetación:

Carlos Gómez Peña

Unai Irusta Zarandona

Verónica Barroso García

Aarón Maturana Candelas

Diseño de portada:

Pablo Núñez Novo

ISBN: 978-84-09-25491-0



Libro de Actas del XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica

Se distribuye bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

Estudio del efecto combinado de la Oxacina 4 Perclorato y la irradiación en la citotoxicidad de células U87

S. Pampín Suárez ¹, F. M. Pérez-Campo ², J. C. Rodríguez-Rey ², J. L. Arce-Diego ¹, F. Fanjul-Vélez ¹

¹ Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Santander, ESPAÑA

² Grupo de Ingeniería de Tejidos, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, ESPAÑA
pampins@unican.es, f.perezcampo@unican.es, josecarlos.rodriguez@unican.es, arcedj@unican.es, fanjulf@unican.es

Resumen

Uno de los campos de aplicación con mayor potencial de la Ingeniería Biomédica lo constituyen las técnicas que emplean radiación en el rango óptico en medicina. Dentro de ellas, el diagnóstico de imagen por fluorescencia es uno de los abordajes más prometedores, ya que permite llevar a cabo una caracterización diagnóstica en tiempo real, con una interacción mínima con los procesos vitales. Sin embargo, la composición heterogénea de los tejidos y sus características ópticas, limitan el uso de esta tecnología. El aprovechamiento de la ventana de transmisión para tejido, con longitudes de onda comprendidas entre 650 y 950 nm, ofrece nuevas oportunidades, ya que incrementa la capacidad de penetración de la luz en los tejidos y disminuye la absorbancia del fotón, el esparcimiento o scattering y la autofluorescencia. Por este motivo, se está trabajando intensamente en la síntesis de nuevos fluoróforos para la implementación de imagen por fluorescencia en este rango de longitudes de onda y sus futuras aplicaciones en medicina. Uno de estos compuestos de nueva generación es la Oxacina 4 perclorato (O4P). Esta molécula se une de manera específica al tejido nervioso. En este trabajo se ha estudiado su citotoxicidad en células U87 mediante un ensayo colorimétrico. Los resultados muestran que concentraciones elevadas de O4P afectan a la viabilidad celular de manera dosis dependiente, tanto en oscuridad, como tras la irradiación a 630 nm. A concentraciones inferiores a 100 μ M, la O4P parece ser inocua, dato importante a tener en cuenta para su uso en futuras aplicaciones médicas.

1. Introducción

La aplicación de las técnicas de la Ingeniería Biomédica a las Ciencias Biológicas, y en particular de aquéllas que emplean radiación óptica, ha permitido el análisis de estructuras subcelulares en 3-D, el estudio en profundidad de las rutas de transducción de señales y los procesos fisiológicos, así como la observación de células enteras e incluso de tejidos y de organismos pluricelulares completos [1], todo ello en tiempo real y con la mínima interacción con los procesos vitales.

En las últimas décadas, varios equipos de investigación de carácter multidisciplinar formados por ingenieros, biólogos, químicos o físicos, entre otros, han acometido el reto de diseñar y desarrollar nuevos sistemas de imagen in vivo, que han podido ser utilizados en diversos campos de la medicina.

La tecnología de imagen por fluorescencia es una de las que más desarrollo ha tenido en biomedicina debido a su

alta especificidad, gran sensibilidad, a la posibilidad de obtención de señales múltiples, a la ausencia de radiación ionizante y la posibilidad de ver imágenes en tiempo real interfiriendo lo menos posible con los procesos biológicos [2].

Tradicionalmente, en fluorescencia, se han empleado longitudes de onda situadas en el espectro visible (400–650 nm), tanto para la excitación, como para la emisión fluorescente. Debido a la propia composición de los tejidos biológicos, la adquisición de señales lumínicas a estas longitudes de onda, se ve perjudicada por la dificultad de penetración del haz de luz en los tejidos (< 3 mm), pero también por fenómenos de absorbancia, reflexión, esparcimiento o scattering, o autofluorescencia de algunas moléculas biológicas [3]. El empleo de radiación óptica cercana al infrarrojo, puede solucionar muchos de estos problemas, pero para ello es necesaria la síntesis de fluoróforos cuyos picos de emisión se encuentren en el rango de estas longitudes de onda. Hasta la fecha, sólo dos de estos colorantes fluorescentes han sido aprobados por la US Food And Drug Administration (FDA), el Verde de Indocianina y el Azul de Metileno, los cuales han demostrado su utilidad en diagnóstico clínico y cirugía [4], [5].

La Oxacina 4 Perclorato (O4P) es un fluoróforo de pequeño tamaño con alta especificidad para tejido nervioso [6], que emite fluorescencia a longitudes de onda cercanas al infrarrojo [7]. Por sus características, podría ser un buen candidato para futuras aplicaciones en el ámbito de la medicina [8]. Un aspecto que es preciso tener en cuenta en la aplicación de este y otros fluoróforos, tiene que ver, además de con su especificidad por el tejido de interés, con su posible citotoxicidad en las condiciones de uso clínico. Los ensayos con pequeños animales, en primer lugar, y su traslación a humanos, requieren de estudios previos sobre citotoxicidad, que relacionen al menos las características de concentración y respuesta a radiación de la sustancia inoculada. Por esta razón, en este trabajo se analiza la citotoxicidad de la O4P en la línea celular humana U87, que representa un buen ejemplo de tejido nervioso.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cultivo celular

La línea de células de glioblastoma U87 de origen humano (ATCC HBT-14) fue cultivada en medio

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina y L-Glutamina al 2 mM, todo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), y fueron mantenidas en condiciones ambientales estándar para su crecimiento, a 37°C y con el 5% de CO_2 .

Se escogió este modelo celular porque, además de su origen humano, la O4P marca específicamente células de tejido nervioso productoras de mielina, como es el caso de las células U87.

2.2. Preparación del fluoróforo

La O4P fue proporcionada por BOC Science (Shirley, NY, USA). Se preparó una solución stock a una concentración 15 mM en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4. La O4P posee un pico de absorbancia a 616 nm y un pico de emisión a 635 nm en este solvente [9]. La Figura 1 muestra la estructura molecular del compuesto.

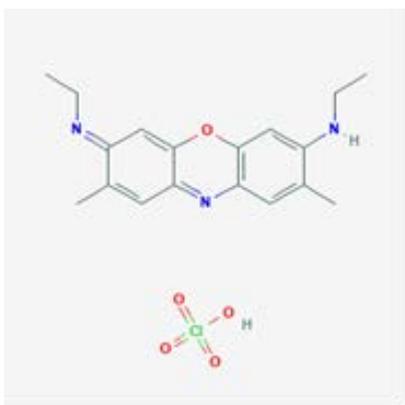


Figura 1. Estructura molecular de la Oxacina 4 Perclorato.

2.3. Sistema de iluminación

El sistema de iluminación LED, cuyo esquema aparece en la Figura 2, fue diseñado para irradiar placas de Petri de 60 mm de diámetro con hasta 6 tipos de radiación. El sistema está compuesto por una fuente LED blanca de alta potencia con una anchura espectral de 200 nm. El sistema de control de la fuente permite la modulación de la misma, de tal forma que es posible controlar la irradiancia de emisión. Mediante una rueda de filtros se configuran los 6 modos de irradiación, de los que en este trabajo se emplea el modo de irradiación con longitud de onda central 630 nm. La radiación resultante se uniformiza mediante un sistema óptico para lograr una exposición homogénea a lo largo de la superficie de la placa de Petri.

Las células se iluminaron desde la parte inferior, durante 15 minutos a 10 mW/cm^2 y a una $\lambda = 630 \text{ nm}$. Las células U87 crecen adheridas al fondo de los pocillos de fondo

plano, por lo que se asumió que el espesor de la placa no interfiere a efectos de la irradiación. La dosis total calculada está en torno a los 9 J/cm^2 .

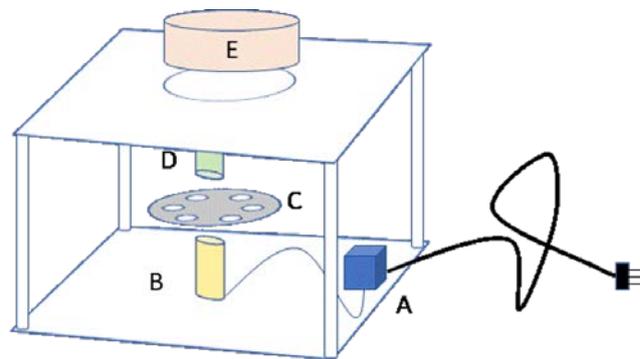


Figura 2. Esquema del diseño del sistema de iluminación de las células. Este dispositivo está compuesto por: A) Un mecanismo de control de la intensidad de la fuente. B) Una fuente LED. C) Una rueda de filtros. D) Un sistema óptico de colimación y homogeneización. En el momento de la irradiación, la placa de Petri se coloca en la abertura creada para ello (E).

2.4. Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad de las células U87 fue evaluada in vitro con el método CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay de PROMEGA (Madison, Wisconsin, USA), basado en el ensayo colorimétrico MTT. Las células fueron cultivadas en placas p60 de CORNING (Corning, NY, USA), con 2 mL de medio. En el momento de realizar el experimento, se lavaron 2 veces con PBS y se les cambió el medio. Se añadieron concentraciones crecientes de O4P (50, 100, 200 y 400 μM), utilizando una solución stock a 15 mM en PBS. Tras 4h de incubación, las células se irradiaron desde abajo por medio de un dispositivo de iluminación controlada creado ad hoc en nuestro laboratorio. Fueron expuestas a 10 mW/cm^2 , durante 15 min a una longitud de onda central de $\lambda = 630 \text{ nm}$. En cada experimento se utilizó como control positivo una placa en la que no se ha añadido fluoróforo y un control negativo de células que no se han sometido a la acción de la luz. Después de la irradiación, las placas se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron con Tripsina-EDTA de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Se inocularon 10^4 células/100 μL en una placa de 96 pocillos (CORNING) y se incubaron a 37°C durante 24h. Para cuantificar el número de células viables se añadieron 20 μL de reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incubaron durante otras 4h en las mismas condiciones, pasadas las cuales se midió la absorbancia a 490 nm.

Los experimentos se repitieron 4 veces de manera independiente. En cada uno de ellos, se han realizado 6 replicados por muestra.

2.5. Análisis estadístico

Para evaluar la respuesta de las células U87 a las distintas dosis de O4P en presencia y ausencia de radiación, se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos variantes con varias muestras por grupo, utilizando el paquete Excel de Microsoft Office. Se consideraron estadísticamente significativos valores con $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

En este estudio se ha analizado el efecto citotóxico de la O4P con el fin de establecer la dosis de compuesto óptima para la realización de ensayos biológicos, y descartar la posible inducción de hormesis, fenómeno de respuesta adaptativa por el que, a distintas dosis, una sustancia se comporta de manera contraria según los estímulos que recibe [10], [11], en este caso la radiación con una fuente de luz.

La Viabilidad celular se calculó según la siguiente ecuación: Viabilidad celular (%) = (A muestra/ A control) x 100.

el comportamiento de las células a las dosis más bajas de O4P testadas (50 y 100 μM), tanto en ausencia como en presencia de luz, es similar, y no se observan diferencias significativas en la proliferación con respecto a las células control. Sin embargo, en oscuridad, las concentraciones más altas de O4P (200 y 400 μM), provocan descensos significativos en la viabilidad celular, del 28,6% y 71,4 %, respectivamente, mientras que a dosis menores no se aprecian efectos significativos. Es decir, el efecto citotóxico de la O4P observado, es dosis dependiente. Este efecto letal parece independiente de la irradiación utilizada, ya que las células que no han sido irradiadas presentan la misma tendencia que las tratadas durante 15 min con luz a una $\lambda=630\text{ nm}$, longitud de onda a la que absorbe el fluoróforo de forma máxima. En este caso, también se produce una disminución significativa de la supervivencia celular con las dosis más elevadas, del 36% y 74,5% para 200 y 400 μM de O4P respectivamente, porcentajes muy similares a los observados en ausencia de luz, por lo que podemos descartar que este compuesto produzca respuesta hormética por el efecto combinado de la concentración y la irradiación a 630 nm.

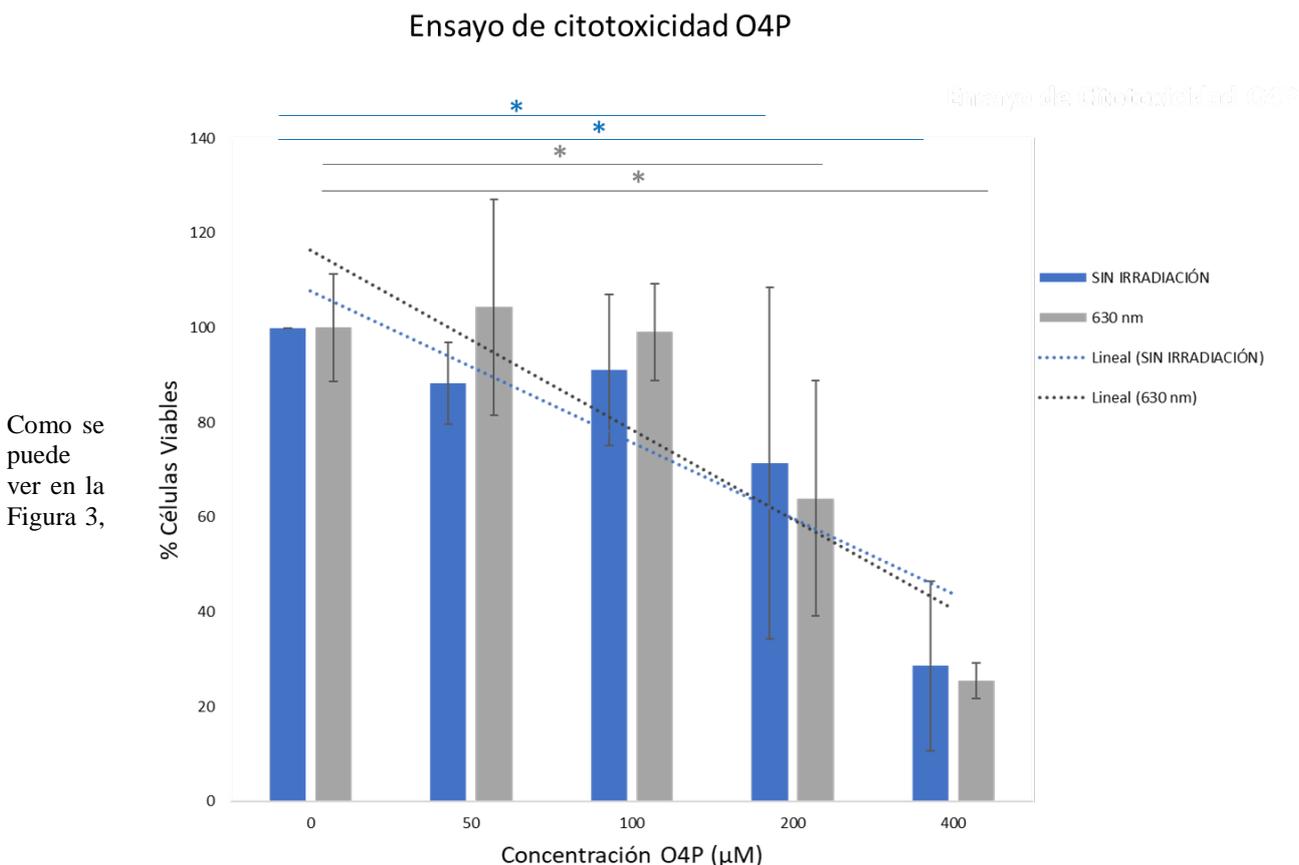


Figura 3. Ensayo de citotoxicidad. Porcentaje de viabilidad de las células U87 en oscuridad y tras 15 min de irradiación a una dosis de $10\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, y una $\lambda=630\text{ nm}$. Las células se han tratado a diferentes concentraciones de O4P (0, 50, 100, 200 y 400 μM), durante 4h. Estos datos representan la viabilidad celular relativa respecto al control negativo en porcentaje, de 4 experimentos independientes. Los resultados se analizaron usando un test ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo. La significación estadística se indica con un asterisco * $p < 0,05$.

4. Conclusiones

Tras la realización de este estudio podemos concluir que la O4P presenta citotoxicidad en células U87, si bien este efecto es dependiente de la dosis, siendo observada a concentraciones superiores a 100 μM . Además, en las condiciones del ensayo, no se detecta acción combinada entre concentración de O4P tras la irradiación durante 15 min a $\lambda=630$ nm y 10 mW/cm², lo que convierte a este fluoróforo en un buen candidato para posibles aplicaciones futuras en el campo de la medicina.

Agradecimientos

Este Trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Modificación mediante alta presión de las propiedades plasmónicas y luminiscentes de nanopartículas de metales y óxidos desnudas y recubiertas” (PGC2018-101464-B-I00), del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, cofinanciado con fondos FEDER y por la Fundación San Cándido.

Bibliografía

- [1] Weissleder R, Pittet MJ. “Imaging in the era of molecular oncology”, 7187, 2008, *Nature*, Vol. 452, págs. 580-589.
- [2] Hong g, Antaris A, Dai H. Near-Infrared fluorophores for biomedical imaging. 0010, 2017, *Nature Biomedical Engineering*.
- [3] Li C, Chen G, Zhang Y, et al. “Advanced Fluorescence Imaging Technology in the Near-Infrared II Window for Biomedical Applications”, 2020, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 142, págs. 14789-14804.
- [4] Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL et al. “The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping”, 10, 2009, *Annals of surgical oncology*, Vol. 16, págs. 2943-2952.
- [5] Tummers QR, Schepers A, Hamming JF et al. “Intraoperative guidance in parathyroid surgery using near-infrared fluorescence imaging and low-dose Methylene Blue”, 5, 2015, *Surgery*, Vol. 158, págs. 1323-1330.
- [6] “Visualizing Oxazine 4 nerve-specific fluorescence ex vivo in frozen tissue sections”, 2016, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, Vol. 9696.
- [7] Barth CW, Gibbs SL, Park MH, Hyun H, Ashitate Y et al. “Prototype nerve-specific near-infrared fluorophores”, 8, 2014, *Theranostics*, Vol. 4, págs. 823-833.
- [8] F. Fanjul-Vélez, A. M. Díaz-Martínez, E. Garro-Martínez, J. L. Arce-Diego, “Fluorescence imaging contrast in guided surgery on nerves measured in rats in vivo”, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, Vol. 11222, 2020, 112220K.
- [9] Park MH et al., “Prototype nerve-specific near-infrared fluorophores”, *Theranostics*, Vol. 4, 2014, págs. 823-833.
- [10] EJ, Calabrese, “Paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose-response model in the toxicological sciences”, 2005, *Environmental Pollution*, Vol. 138, págs. 379-412.
- [11] EJ, Cook RC and Calabrese. “The importance of hormesis to public health”, 2006, *Environment Health Perspective*, Vol. 114, págs. 1631-1635.