



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

APOPTOSIS INDUCIDA POR HIPERTERMIA MAGNÉTICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO RECUBIERTAS CON TETRAHIDROXIQUINONA

Michelle Valdovinos*, Zaira López, M. Eduardo Cano & Peter Knauth

*Cell Biology Laboratory, Centro Universitario de la Ciénega,
Universidad de Guadalajara. 47810 Ocotlán (Jal.), México*

michelle.valdovinos@alumnos.udg.mx

Resumen

La tetrahidroxiquinona (THQ) es un compuesto orgánico con propiedades fisicoquímicas, magnéticas y biológicas prometedoras para fines biomédicos, que, además, ha demostrado capacidad para inducir apoptosis, por lo que se considera un candidato interesante para iniciar experimentos para el tratamiento del cáncer. En este trabajo, se evaluó la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de hierro (IONPs) recubiertas con THQ para ser usadas en hipertermia magnética (MHT). Para los experimentos biológicos se utilizó la línea celular humana de cáncer de colon HT-29, que fue expuesta a diferentes concentraciones (0,03 a 3 mg/ml) de IONPs-THQ y posteriormente sometida a MHT durante 20 min a temperaturas desde los 37 a 48 °C. Los resultados demostraron que, hasta 2 mg/ml, las IONPs-THQ no tienen un efecto citotóxico en las células HT-29. Los ensayos de MHT mostraron un buen calentamiento de las IONPs y un incremento del porcentaje de muerte celular por apoptosis hasta ~15% a 45 °C. Además, se observó que, a temperaturas moderadas de 39 °C, durante 15 min, hay una reducción de la actividad metabólica del ~50%, lo que indica que un ligero aumento de temperatura puede ser suficiente para potencializar los efectos de THQ, es decir, posiblemente hay un efecto sinérgico entre ambos tratamientos para conducir a la muerte celular por apoptosis.

Palabras clave: hipertermia magnética, zztetrahidroxiquinona, IONP, cáncer

Abstract

Tetrahydroxyquinone (THQ) is an organic compound with promising physicochemical, magnetic and biological devices, and, moreover, it has been shown to induce apoptosis by producing reactive oxygen species (ROS), thus it is an interesting candidate to be used in experiments in cancer therapy. In this work, the cytotoxicity of THQ-coated iron oxide nanoparticles (IONPs) used in magnetic hyperthermia (MHT) has been evaluated. Therefore, the human colon cancer cell line HT-29 was exposed to different concentrations (0.03 to 3 mg/ml) of IONP-THQ, as well as to MHT treatment for 20 min reaching temperatures from 37 to 48 °C. Up to 2 mg/ml IONP-THQ did not exhibit cytotoxic effects on HT-29 cells, thus this concentration has been used for the further MHT experiments. MHT at 45 °C induced apoptosis in ~15% of the treated cells. Moreover, MHT already at 39 °C reduced the



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



metabolic activity of HT-29 by ~50%, indicating that this slight temperature increase during only 20 min may have increased the ROS formation by THQ thus was potentializing the cytotoxic effect.

Key words: magnetic hyperthermia, tetrahydroxyquinone, IONP, cancer

Introducción

THQ es un compuesto orgánico poco hidrosoluble (<14 g/l) que, cuando se disuelve en agua, tiene unidas dos moléculas de H₂O mediante puentes de hidrógeno. Por su estructura de quinona y en presencia de O₂ tiene una alta capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante su autooxidación, formando un radical superóxido y semiquinona (González *et al.*, 2022). Esta característica, en combinación con una disminución de la señalización de supervivencia dependiente de la proteína quinasa B (AKT/PKB), promueve la apoptosis en células leucémicas HL60 (Martins Cavagis *et al.*, 2006). Además, THQ causa efectos citotóxicos en fibroblastos de hámster chino V79 por alterar la homeostasis de Ca²⁺ y generar H₂O₂, lo cual inhibe la función mitocondrial y la síntesis de ADN (De Souza-Pinto *et al.*, 1996). A pesar de las pocas publicaciones científicas acerca de THQ en el campo biomédico o biotecnológico, por sus efectos pro-apoptóticos se considera un candidato prometedor para recubrir IONPs e iniciar experimentos *in-vitro* tratando células cancerígenas por MHT; las ventajas que dicha cubierta provee a las IONPs son proporcionadas por sus características i) fisicoquímicas, como tamaño y forma adecuados que facilitan la internalización celular, ii) magnéticas, por ejemplo, buena estabilidad coloidal y saturación magnética así como tasa de absorción específica elevadas que contribuyen a una mejor

respuesta a la hipertermia magnética, y iii) biológicas, como baja citotoxicidad (González *et al.*, 2022). La unión de THQ con el hierro es mediante uno de sus grupos hidroxilo, probablemente mediante interacciones iónicas (**Figura 1**). Por otro lado, la MHT es una terapia que consiste en la administración de nanopartículas dentro del área tumoral seguida de la exposición a un campo magnético alterno, el cual, mediante bobinas de inducción, rodea el objeto biológico externo y produce agitación de las nanopartículas. La energía resultante se transfiere a las células vecinas en forma de calor, lo que eleva la temperatura, por encima de los 43 °C (Fatima *et al.*, 2021); sin embargo, se ha detectado apoptosis a partir de los 39 °C, siendo aún más notoria a temperaturas más altas (42 – 48 °C) (González *et al.*, 2022). Los métodos convencionales de hipertermia afectan tanto a los tejidos tumorales como a los sanos por su baja especificidad (Mortezaei *et al.*, 2021); estos inconvenientes se pueden reducir por el calor localizado, generado por MHT, que provoca la muerte de las células cancerosas, ya que son más sensibles al calor que las células sanas (Fatima *et al.*, 2021), y, por lo tanto, evitan un daño al tejido normal, lo cual le da una ventaja ante otras técnicas de calentamiento. De esta forma, las propiedades de THQ combinadas con MHT potencializan la capacidad de muerte celular por apoptosis.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento sinérgico de nanopartículas recubiertas con tetrahidroquinona en células de cáncer de colon sometidas a hipertermia magnética y la determinación de muerte celular por apoptosis.

Metodología

1. Cultivo celular

La línea celular humana de cáncer de colon, HT-29, se cultiva **en frascos T-25** con medio de cultivo **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)** suplementado con 10% de **suero fetal bovino** a 37 °C, 95% de **humedad relativa** y 4% CO₂. Para los experimentos con IONPs se agrega antibiótico (PenStrep, 1x) al medio de cultivo.

2. Citotoxicidad

HT-29 se cultiva sobre un **cubeobjetos** en pocillos de 2 cm de diámetro que contienen 1 ml de medio de crecimiento y se incuban durante 24 h para su adherencia. Después se agrega IONPs a diferentes concentraciones (**0,03, 0,3, 1, 2 y 3 mg/ml**) y se incuban las células por 24 h más. Posteriormente se retira el medio, se lavan las células tres veces con **tampón fosfato salino (PBS)** y se agrega medio nuevo que contiene 2% de **tetrazolio soluble en agua (WST)**. Se incuban las células durante 2 a 4 h en las que las células metabólicamente activas reducen, por su actividad de deshidrogenasas, el tetrazolio (amarillo) a formazan (rojo), que se cuantifica midiendo la absorbancia del medio de cultivo a 440 nm. Se realiza un ensayo semi-cuantitativo con azul de tripano (TB) en el cual se añade a las células crecidas sobre **cubeobjetos** 5% de TB,

se incuba 5 min y se observa las células bajo el microscopio para estimar tanto la confluencia como el porcentaje de células teñidas; solo las células necróticas se tiñen de azul.

3. Hipertermia magnética

En diferencia al experimento de citotoxicidad, se incuban las células con las IONPs añadidas solamente durante 2 h para su internalización. Posteriormente se les somete a MHT durante 20 min, usando una frecuencia fija de $f = 530 \pm 0,1$ kHz y calentando cada muestra a 37, 39, 42, 45 y 48 °C. Por último, se incuban las células en condiciones estándar durante 24 h y se sigue el método de citotoxicidad mencionado anteriormente.

4. Apoptosis

Después de la hipertermia magnética, en vez de medir el efecto citotóxico, se determina la apoptosis inducida por lavar las células (crecidas sobre cubeobjetos) con PBS y después con **tampón de ensayo** para ajustar la concentración de Ca²⁺. Posteriormente se incuban las células con Annexin V-FITC y propidium iodide (PI) durante 15 min en oscuro. A continuación, se lava las células nuevamente con tampón de ensayo y se observa las células bajo el microscopio de epifluorescencia con filtros de color verde (para FITC) y rojo (para PI). Las células apoptóticas se tiñen de verde, las necróticas de verde y rojo, mientras que las células sanas no se tiñen. (González *et al.*, 2022).

Resultados

Las células HT-29 fueron expuestas a diferentes concentraciones de las IONPs-THQ (**0.03, 0.3, 1, 2 y 3**



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



mg/ml); a concentraciones de hasta 2 mg/ml las células se mantienen altamente viables, muy similar al control, mientras que a concentraciones mayores de 2 mg/ml, se reduce la actividad metabólica (**Figura 2 (a)**). Además, las células se tiñen de azul con TB indicando que la membrana celular está comprometida (necrosis). Asimismo, a estas concentraciones elevadas, aproximadamente el 15% de las células se tiñen con PI, indicando necrosis (**Fig. 2 (b)**).

Los resultados de la actividad metabólica demuestran que, hasta 2 mg/ml, las IONPs-THQ no tienen un efecto citotóxico en las células HT-29, es decir, que son viables para ser usadas en un tratamiento por MHT. Así, células HT-29 con 2 mg/ml de IONPs-THQ fueron expuestas a MHT alcanzando durante 20 min temperaturas de 37 a 48 °C.

La actividad metabólica relativa de HT-29 disminuyó constantemente, desde 100% del control (37 °C) hasta 5% a 48 °C (**Figura 3**). Esto indica que el daño celular fue producido principalmente por el tratamiento térmico, aunque hasta aquí no se conoce el tipo de daño que causó la muerte celular. En algunos trabajos se ha reportado que a temperaturas de entre 42 a 45 °C se induce apoptosis; además, ha sido demostrado que THQ induce apoptosis a través de la producción de ROS.

En base a estos conocimientos se realizaron ensayos de MHT a temperaturas de 43 y 45 °C, usando la misma concentración de 2 mg/ml de IONPs-THQ, para distinguir la muerte celular entre necrosis y apoptosis (Annexin V-FITC/PI). Aparte de que, con el aumento

de la temperatura, incrementó el porcentaje de las células muertas por necrosis (subió de ~20% a 43 °C a ~25% a 45 °C), también aumentó el número de células muertas por apoptosis: de ~10% a 43 °C a ~15% a 45 °C (**Figura 4**).

Hay que resaltar, que el efecto térmico por MHT y a temperaturas moderadas de 39 °C, durante 20 min, reduce la actividad metabólica a ~50%. Temperaturas más altas, de 43 y 45 °C, tienen un efecto en reducir la actividad metabólica, a ~30% y 20% respectivamente, menos pronunciado. Podría ser, que el incremento ligero de la temperatura sea suficiente para incrementar la formación de ROS por THQ, indicando un efecto sinérgico entre ambos.

Conclusiones

- 1) Las IONPs-THQ no son tóxicas para las células HT-29 en concentraciones desde **0,03** hasta 2 mg/ml
- 2) Cuando las células HT-29 son sometidas a hipertermia magnética con IONPs-THQ (2 mg/ml) de 37 hasta 48 °C, se induce muerte celular (la **actividad metabólica** disminuye de 100 hasta el 5%)
- 3) La muerte celular de las células HT-29 con IONPs-THQ, cuando son sometidas al tratamiento térmico, es vía apoptosis

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

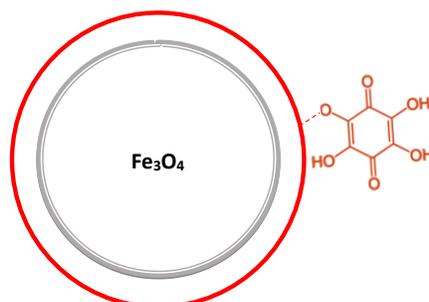


Figura 1. Nanopartícula de óxido de hierro recubierta con tetrahidroxiquinona (IONP-THQ).

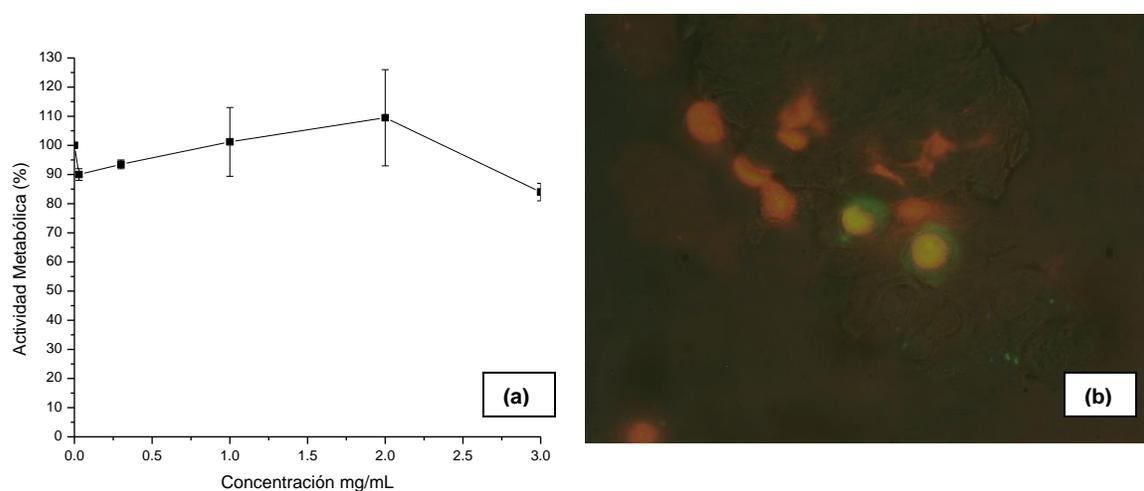


Figura 2. (a) Actividad metabólica de la línea celular HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de IONP-THQ durante 24 h. (b) Tinción con Annexin V-FITC/PI de células HT-29, expuestas a 2 mg/ml de IONPs-THQ durante 24 h.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

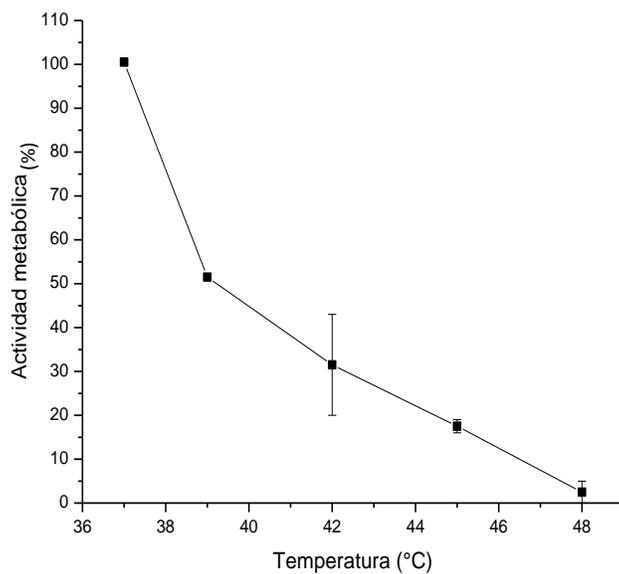


Figura 3. Actividad metabólica de células HT-29 expuestas a un campo magnético alterno, con 2 mg/ml de IONPs-THQ, durante 20 min alcanzando diferentes temperaturas (37 - 48 °C).

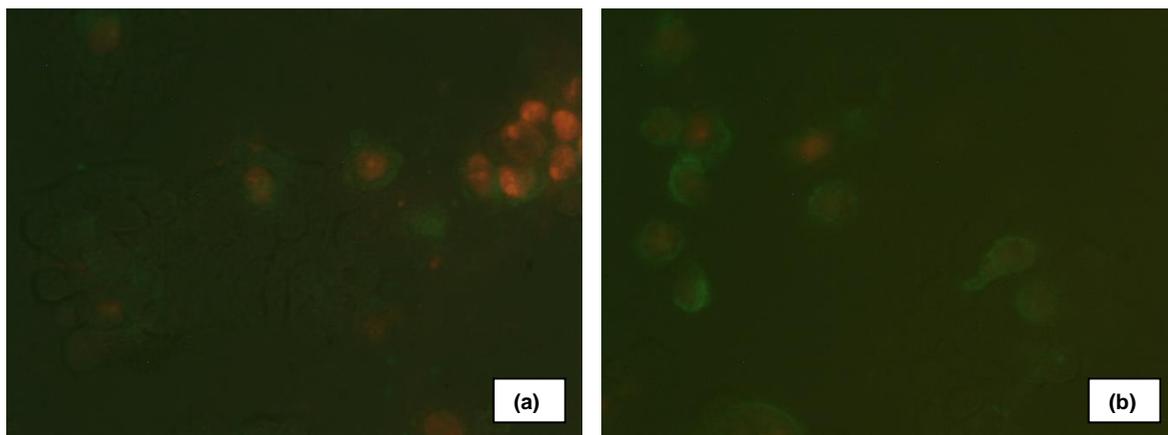


Figura 4. Células HT-29 con 2 mg/ml de IONPs-THQ expuestas a MHT por 15 min y teñidas con Annexin V / PI: células calentadas a (a) 43 °C y (b) 45 °C.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Bibliografía

De Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E. & Hoffmann, M. E. (1996). Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: Involvement of Ca^{2+} and H_2O_2 in the impairment of DNA replication and mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(5): 657–666.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02179-](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02179-5)

5

Fatima, H., Charinpanitkul, T. & Kim, K. S. (2021). Fundamentals to apply magnetic nanoparticles for hyperthermia therapy. *Nanomaterials*, 11(5): id1203.
<https://doi.org/10.3390/nano11051203>

González, A. G., Casillas, N., López, Z., Cervantes, O., Knauth, P., Hernández-Gutiérrez, R., Topete-Camacho, A., Rosales, S., Quintero, L. H., Paz, J. A., Flores, X. & Cano, M. E. (2022). Tetrahydroxyquinone: A suitable coating for ferrofluids used in magnetic

hyperthermia. *Coatings*, 12(8): id1130.
<https://doi.org/10.3390/coatings12081130>

Martins Cavagis, A. D., Ferreira, C. V., Versteeg, H. H., Assis, C. F., Bos, C. L., Bleuming, S. A., Diks, S. H., Aoyama, H. & Peppelenbosch, M. P. (2006). Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukemia cells through diminished survival signaling. *Experimental Hematology*, 34: 188–196.
<https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2005.11.001>

Mortezaee, K., Narmani, A., Salehi, M., Bagheri, H., Farhood, B., Haghi-Aminjan, H. & Najafi, M. (2021). Synergic effects of nanoparticles-mediated hyperthermia in radiotherapy / chemotherapy of cancer. *Life Sciences*, 269: id119020.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119020>