

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN NANOVECTOR
CARGADO CON CARBOPLATINO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”

POR:

M.C.P. CÉSAR ADRIÁN LEYVA GONZÁLEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA

AGOSTO 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN NANOVECTOR
CARGADO CON CARBOPLATINO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”

POR:


M.C.P. CÉSAR ADRIÁN LEYVA GONZÁLEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA


AGOSTO 2020.

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN NANOVECTOR
CARGADO CON CARBOPLATINO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”**


Aprobación de la tesis:



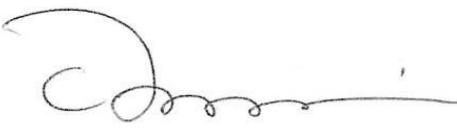
Dr. C. Adolfo Solo Domínguez
Director de tesis



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Co-directora de tesis



Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Monterrey, Nuevo León

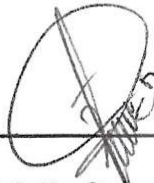
Agosto de 2020

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN NANOVECTOR CARGADO CON CARBOPLATINO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”

Presentado por

MCP César Adrián Leyva González.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Histología, Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adolfo Soto Domínguez y la Co-dirección de la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas.



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Co-directora

RESUMEN

MCP César Adrián Leyva González
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN NANOVECTOR CARGADO CON CARBOPLATINO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”

Páginas del estudio: 73

Área del estudio: Morfología

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología

Propósito y Método del Estudio

El cáncer es un problema importante en la salud pública mundial cuyo tratamiento está en constante evolución. La terapéutica convencional consiste de cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. La quimioterapia es ampliamente utilizada, sin embargo es causante de severos efectos adversos. Es por ello que en la constante búsqueda de desarrollar novedosas terapéuticas anticancerígenas, surgen tecnologías como la nanomedicina. En este estudio empleamos nanotubos de carbono de pared múltiple, los cuales fueron tratados con métodos químicos para su oxidación, funcionalización con ácido hialurónico, y carga de carboplatino en su interior mediante un proceso de nanoextracción. Con esto se obtuvo un nanovector oxidado, funcionalizado con ácido hialurónico y cargado con carboplatino, que demostró poseer biodireccionamiento hacia células tumorales humanas sin producir efecto citotóxico significativo en células no tumorales.

Conclusiones y contribuciones

Se observó que el nanovector posee mayor efecto citotóxico que el carboplatino en las células tumorales humanas, esto se atribuye al biodireccionamiento del nanovector. Por otra parte, nuestro nanovector mostró menor efecto citotóxico que el carboplatino en células no tumorales.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi asesor, Dr. C. Adolfo Soto Domínguez por ser un ejemplo a seguir, quien con su paciencia, experiencia y gran conocimiento me ha formado y guiado en el campo de la ciencia. Él siguió cada una de las etapas de éste proyecto con lo que fue posible obtener los resultados buscados.

También quiero agradecer al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL por brindarme todas las herramientas y recursos necesarios para concluir éste proyecto de tesis.

Agradezco a mis padres, Hugo Eduardo Leyva Flores y María de Jesús González Ramírez, a mi hermana Julia Leyva y a mi ángel Dolores Flores, por estar a mi lado en mis altibajos y en cada logro obtenido, por brindarme todo su amor, paciencia y apoyar cada una de mis decisiones.

A mi compañero y amigo Daniel Salas, quien me transmitió gran parte de su amplio conocimiento. Gracias por tu paciencia y dedicación.

A mi compañera de generación, mejor amiga y hermana del alma Bárbara González. Gracias por tu apoyo incondicional y por demostrarme lo que significa realmente una amistad. Estos dos años fueron más llevaderos a tu lado. Eres la mejor Q.C.B. A mi mejor amigo, Eduardo Zul, por creer en mí y por brindarme con paciencia y entusiasmo tus conocimientos y por motivarme a mejorar.

A Gemma Estrada, mi “partner in lab”, te admiro y te quiero mucho, gracias por las memorias que formamos en todo éste tiempo, nunca las olvidaré.

A mis compañeros de laboratorio Ana Duarte, Yareth Gopar, Alejandra Martínez, Alfredo González, Abigail Robles, a quienes agradezco con sinceridad todo su apoyo y consejos.

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría. Gracias por brindarme el apoyo económico, registrado con el número de beca 928661.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES	13
Nanotecnología	13
Nanotubos de carbono	14
Funcionalización de los Nanotubos de Carbono.....	17
Biodireccionamiento	19
Biodistribución y Toxicidad de los CNT	19
Biodegradación	20
Antecedente directo	21
Justificación.....	25
Hipótesis	25
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
Material y equipo.....	27
Reactivos.....	27
Soluciones.....	28
Equipo	28
Métodos.....	29
<i>Síntesis del Nanovector gráfenico funcionalizado con HA y cargado con CPT</i>	<i>29</i>
<i>Caracterización de cCNT y oxCNT/HA/CPT</i>	<i>30</i>
<i>Establecimiento de las líneas celulares</i>	<i>31</i>
<i>Inmunofluorescencia para la determinación de CD44</i>	<i>31</i>
<i>Ensayos con MTT</i>	<i>32</i>
<i>Ensayos de contraste de núcleos con DAPI</i>	<i>33</i>
<i>Ensayos con MTT</i>	<i>33</i>
<i>Ensayos de contraste de núcleos con DAPI</i>	<i>34</i>
4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSIÓN	63
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	67
Conclusiones:.....	67
Perspectivas:.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de los nanotubos de carbono	15
Figura 2. Caracterización del nanovector	22
Figura 3. Endocitosis del nanovector	23
Figura 4. Citotoxicidad del nanovector	24
Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de los cCNT	36
Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de los oxCNTHACPT.....	36
Figura 7. Expresión del receptor CD44.....	38
Figura 8. Células NIH-3T3 en cultivo tratadas por 24 h con cCNT	40
Figura 9. Células NIH-3T3 en cultivo tratadas por 24 h con oxCNT	41
Figura 10. Células NIH-3T3 en cultivo tratadas por 24 h con oxCNTHA.....	42
Figura 11. Células NIH-3T3 en cultivo tratadas por 24 h con oxCNTHACPT	43
Figura 12. Células NIH-3T3 en cultivo tratadas por 24 h con CPT.....	44
Figura 13. Células HeLa en cultivo tratadas por 24 h con cCNT.....	46
Figura 14. Células HeLa en cultivo tratadas por 24 h con oxCNT	47
Figura 15. Células HeLa en cultivo tratadas por 24 h con oxCNTHA.....	48
Figura 16. Células HeLa en cultivo tratadas por 24 h con oxCNTHACPT	49
Figura 17. Células HeLa en cultivo tratadas por 24 h con CPT.....	50
Figura 18. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular NIH-3T3	52
Figura 19. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular HeLa.....	53
Figura 20. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular MDA-MB-231.....	54
Figura 21. Citotoxicidad de los nanotubos en las líneas celulares NIH-3T3, HeLa y MDA-MB-231..	56
Figura 22. Selectividad del nanovector en la línea celular NIH-3T3	58
Figura 23. Selectividad del nanovector en la línea celular HeLa	59
Figura 24. Selectividad del nanovector en la línea celular MDA-MB-231	60
Figura 25. Selectividad del nanovector en las líneas celulares NIH-3T3, HeLa y MDA-MB-231.....	62

Lista de abreviaturas

CPT: Carboplatino

nm: Nanómetros

ml: Mililitros

μl: Microlitros

cCNT: Nanotubos de carbono comerciales

oxCNT: Nanotubos de carbono oxidados

oxCNTHA: Nanotubos de carbono funcionalizados con ácido hialurónico

oxCNTHACTP: Nanotubos de carbono funcionalizados con ácido hialurónico y cargados con carboplatino.

SWCNT: Nanotubos de carbono de pared simple

MWCNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

PEI: Polietilenimina

HA: Ácido Hialurónico

min: Minutos

h: Horas

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EDC-HCL: N-Etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)Carbodiimida hidrocioruro

NHS: N-Hidroxisuccinimida

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

PBS: Tampón Fosfato Salino

TBST: Solución Salina Tamponada con Tris y Tween 20

CO: Monóxido de Carbono

CO₂: Dióxido de Carbono

CH₄: Metano

C₂H₂: Acetileno

N: Nitrógeno

C₂H₄: Etileno

C₂H₆: Etano

C₂H₅OH: Etanol

C₄H₈O₂: Acetato de Etilo

HNO₃: Ácido Nítrico

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

O₃: Ozono

i.v: Intravenosa

i.p: Intraperitoneal

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

TGF α: Factor de crecimiento transformante alfa

TGA: Termogravimetría

FTIR: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

pRB: Proteína de Retinoblastoma

TA: Temperatura Ambiente

MTT: Bromuro de tiazolil tetrazolium azul

ROS: Especies reactivas de oxígeno

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades en las cuales existen células anormales que se multiplican sin control, las cuales pueden llegar a ser capaces de producir invasión local o bien diseminarse por vía sistémica a través del sistema sanguíneo o linfático tras lo cual producen metástasis (NIH, 2015). Dicha condición representa un problema importante en la Salud Pública debido a que es la segunda causa de muerte en el mundo, produciendo 1 de cada 6 muertes (WHO, 2018). Mientras que en México ocupa la tercera causa de muerte produciendo 14 de cada 100 muertes (Secretaría de Salud, 2017).

Para intentar combatir este problema de salud existen diversas modalidades terapéuticas, la elección de ésta dependerá del tipo de cáncer y lo avanzado del mismo. Las modalidades terapéuticas de uso más frecuente son: cirugía, radioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y/o quimioterapia (NIH, 2015).

De las diferentes modalidades terapéuticas, la quimioterapia es el principal tratamiento de elección en gran parte de los cánceres de estadio avanzado (Alam et al., 2018).

Entre los agentes quimioterapéuticos más empleados se encuentra el carboplatino (CPT), que pertenece al grupo de los compuestos platinados. Es una droga ampliamente usada para diversos tipos de cáncer, sin embargo su uso se restringe debido a los severos efectos adversos causantes incluso a bajas dosis, lo cual es debido a su inespecificidad. Entre los efectos adversos reportados con el empleo de esta droga destacan: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, mielosupresión, anafilaxia, citopenias, hepatotoxicidad, ototoxicidad, cardiotoxicidad, náuseas, vómitos, diarrea, alopecia, caquexia, anorexia y astenia. Para intentar evitar estos efectos adversos es necesario disminuir la dosis del fármaco, pudiendo no ser tan efectivo para tratar el problema de origen (Oun, Moussa, & Wheate, 2018).

Como consecuencia de esto, un gran número de pacientes presentan recaídas en la evolución de su enfermedad, tras responder adecuadamente de manera inicial a la quimioterapia. Esto se traduce en una insensibilidad al tratamiento anti-cancerígeno adquiriendo la denominada quimioresistencia (De la Vega et al., 2010).

Por ello emergen tecnologías como la nanomedicina, la cual es una rama de la nanotecnología que se puede utilizar en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades. Su objetivo es el desarrollo de nanosistemas de liberación de fármacos, que tienen un gran potencial para revolucionar la terapéutica convencional, en especial aquella dirigida contra el cáncer. Se han logrado desarrollar nanoacarreadores de fármacos antineoplásicos que han demostrado efectividad contra neoplasias quimiorresistentes, esto debido a la versatilidad de las nanopartículas para ser funcionalizadas, de manera que es posible biodirigir el nanovector hacia las células tumorales (Aguirre, Castrejón & Méndez, 2016).

Debido al constante problema que representa la quimioresistencia para el tratamiento del cáncer, nuestro equipo de trabajo propone en este estudio el empleo de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), funcionalizado con ácido hialurónico (HA) y cargado con CPT, para su empleo como un nanovector acarreador de fármaco que sea capaz de biodirigirse hacia las células tumorales.

El uso de un nanovector a base de nanotubos de carbono funcionalizados y cargados con CPT (OxCNTHACPT), es una estrategia importante para la entrega de fármacos, proponiéndose como una terapéutica novedosa en la que el fármaco antineoplásico sea entregado de manera selectiva hacia células tumorales, a la vez que se requiere de una menor dosis del tratamiento para lograr un efecto citotóxico.

2. ANTECEDENTES

Nanotecnología

La nanotecnología es un campo multidisciplinario cuyo objetivo es controlar la materia a nivel atómico y molecular. Se han desarrollado diferentes aplicaciones de la nanotecnología a través del tiempo, sobre todo en los siguientes campos: energía, electrónica, alimentación, agricultura y en la salud (Kargozar & Mozafari, 2018).

La Fundación Nacional de Ciencia y la Iniciativa Nacional de Nanotecnología definen que la nanotecnología se encarga de manipular materiales a nanoescala de entre 1 a 100 nanómetros (nm), y que sus propiedades físicas hacen posible sus múltiples aplicaciones novedosas. A esta escala las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas son diferentes a las de los mismos materiales a escala convencional, lo cual ha generado interés por su aplicación en gran variedad de campos (Nowak & Bucheli, 2007).

El empleo de la nanotecnología para fines médicos se denomina nanomedicina y se define como el uso de nanomateriales para el diagnóstico, monitoreo, control, prevención y tratamiento de enfermedades. La nanomedicina tiene un gran potencial para revolucionar la terapéutica convencional debido a las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, las cuales son objeto de investigación, con lo que se busca demostrar que el campo de la nanomedicina tiene capacidad para formar parte de la siguiente generación de innovación biomédica (Tinkle et al., 2014).

Entre los principales inconvenientes de la medicina convencional se encuentra que la mayoría de los medicamentos no son específicos ni solubles en el agua, lo cual representa un problema a superar. Es aquí cuando la nanomedicina toma relevancia debido a que se ha logrado desarrollar nanopartículas que funcionan como nanovectores, los cuales se diseñan y modifican para que posean la capacidad de solubilizarse en agua además de actuar como partículas dirigidas hacia un blanco

terapéutico y controlar la liberación del medicamento que acarrean. Las nanopartículas dirigidas a células tumorales son un foco de atención en la investigación de este campo, se han desarrollado nanopartículas que contienen uniones covalentes con moléculas que son el ligando de receptores expresados en células tumorales, lo cual les otorga especificidad obteniéndose resultados prometedores.

Entre los nanomateriales que son objeto de investigación en la última década por su capacidad como nanovectores destacan:

- Materiales de carbono: fullerenos (principalmente C₆₀), nanotubos de pared simple (SWCNT) y de pared múltiple (MWCNT), óxido de grafeno y nanodiamantes.
- Nanopartículas de oro.
- Nanopartículas súper paramagnéticas de óxido de hierro: magnetita, óxido de hierro y silica.
- Puntos cuánticos.
- Polímeros y otras macromoléculas.
- Liposomas. (Astruc, 2015).

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNT) son nanoestructuras cilíndricas con propiedades únicas, las cuales permiten su empleo en una variedad de campos. Fueron sintetizados por primera vez en 1991 por Iijima, mediante el método de arco de descarga. Sin embargo, pasaron desapercibidos debido al desconocimiento de sus propiedades y a la falta de atención en el campo de la nanomedicina en ese entonces (Iijima, 1991).

Los CNT también son conocidos como fullerenos tubulares y consisten en láminas cilíndricas enrolladas de grafeno con átomos de carbono de hibridación sp^2 . Se clasifican en dos categorías con base en la complejidad de sus paredes:

- Nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT): Compuestos por una sola lámina de grafeno enrollada sobre sí misma, poseen un diámetro de 1-2 nm. La longitud es variable y depende del método empleado para su síntesis.
- Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT): Consisten en dos o más láminas de grafeno enrolladas sobre sí mismas cuyo diámetro va de 2 a los 50 nm, dependiendo del número de capas de grafeno que los compongan. Existe una distancia inter-capa de aproximadamente 0.34 nm (Saeed & Ibrahim, 2013) (Figura 1).

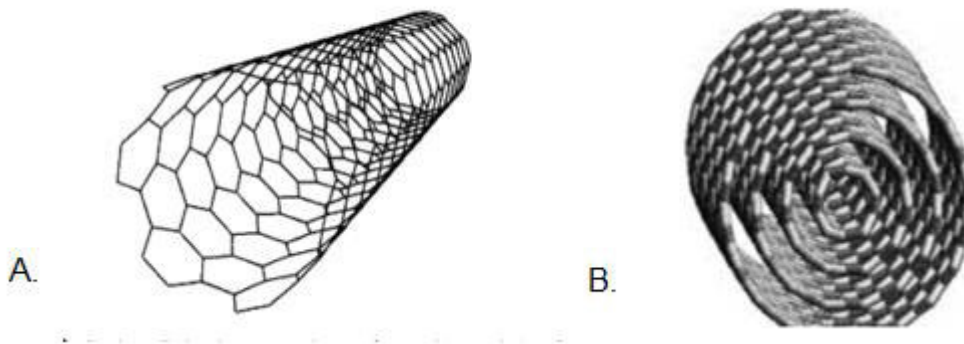


Figura 1. Representación esquemática de los nanotubos de carbono. Se visualiza su superficie e interior. A. Nanotubos de carbono de pared simple, compuestos por una sola lámina de grafeno enrollada. B. Nanotubos de carbono de pared múltiple, compuestos por más de dos láminas de grafeno concéntricas enrolladas.

Síntesis

Se emplean diferentes métodos para la síntesis de los CNT:

- Método de evaporización de arco de descarga: Empleado por primera vez en 1991 por lijima. Se basa en el empleo de tres componentes principales: argón, hierro y metano. Se emplean corrientes continuas de 200 A a 20 V. Ha sido usado para la síntesis de CNT a gran escala (Karthikeyan, Mahalingam & Karthik, 2009).
- Ablación láser: En ésta técnica el grafito se bombardea con láser. El nanotubo crece hasta que se han añadido suficientes átomos del catalizador en los extremos (Thess et al., 1996).
- Deposición química de calor: Empleada por primera vez en 1996, con éste método es posible controlar la dirección del crecimiento del sustrato, así como la síntesis de una gran cantidad de CNT. En ésta técnica se emplea una mezcla de gas hidrocarbonado, acetileno (C_2H_2), metano (CH_4), o etileno (C_2H_4) y nitrógeno (N) en una cámara de reacción. Los nanotubos se sintetizan por la descomposición del hidrocarburo a altas temperaturas (700-900 °C) a presión atmosférica. Es el método de síntesis más empleado (Xie et al., 2000).
- Crecimiento en fase de vapor: Es una técnica nueva y básicamente es una modificación de la técnica de deposición química de calor. Difiere de ésta última en que los CNT se sintetizan directamente a partir del gas de reacción y el metal catalítico en la cámara, sin el empleo de un sustrato. Se emplea el ferroceno como catalizador (Lee et al., 2002).
- Método de síntesis de llama: Éste método emplea flamas de hidrocarburos, las cuales permiten la síntesis de los nanotubos. Los gases presentes en las flamas como monóxido de carbono (CO), CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 y etano (C_2H_6), son la fuente de carbono (Hahm et al., 2011).

Funcionalización de los Nanotubos de Carbono

Los CNT son insolubles en agua debido a su naturaleza grafénica y tienden a formar aglomerados, su solubilidad es muy limitada en cualquier disolvente conocido. Esto representa un problema para su aplicación como nanosistemas liberadores de fármacos en el campo de la nanomedicina. Es por ello que se ha logrado modificar la superficie de los nanotubos mediante un proceso conocido como funcionalización química, en donde se añaden uniones orgánicas covalentes que solucionan el inconveniente de la insolubilidad de estas nanoestructuras (Rosario et al., 2005).

El proceso de funcionalización puede definirse como: La modificación de propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los CNT. Con esto se logran cambios en las propiedades físico-químicas de estas nanopartículas, tales como mejoras en la dispersión y solubilidad de las mismas, lo cual permite que interactúen con otras moléculas biológicas, permitiendo así una aplicación optimizada para su uso en sistemas biológicos (Enyashin & Ivanovskii, 2007).

Se han desarrollado diferentes estrategias para la funcionalización de los nanotubos de carbono comerciales (cCNT), entre ellas se encuentran:

- **Funcionalización en los sitios de defecto:** Es el método de funcionalización más empleado. En ésta estrategia son de uso frecuente el ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), o una combinación de estos. Con esta estrategia se añaden grupos funcionales hidrofílicos a las paredes de los cCNT, tales como carboxilo ($-\text{COOH}$), carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) e hidroxilo ($-\text{OH}$) (Datsyukc et al., 2008). Además, con esta técnica se eliminan elementos trazas de los CNT tales como los catalizadores empleados en el proceso de síntesis, así como los carbonos amorfos. También acorta la longitud de los CNT, permitiendo una mejor

aplicación biomédica ya que disminuyen su toxicidad y mejoran su biocompatibilidad (Pastorin, 2009).

- Funcionalización covalente de los CNT: Se produce tensión local en los CNT debido a la curvatura de sus paredes, lo que promueve dos factores principales: la desalineación orbital π entre carbonos adyacentes, y la piramidalización en el átomo de carbono. Dicha desalineación orbital π de las paredes laterales (que no está presente en las capas de los nanotubos) les otorga reactividad química (Banerjee, Benny & Wong, 2005). Los CNT por su naturaleza contienen enlaces carbono-carbono dobles (alquenos) o triples (alquinos) así como sitios defectuosos los cuales permiten las reacciones de adición (Holzinger et al., 2001).
- Funcionalización no covalente de los CNT: Se considera un método no destructivo ni invasivo. Con su empleo se conserva la naturaleza química y estructural de los CNT, sin embargo, se modifican sus características hidrofóbicas en hidrofílicas. En éste método se emplean moléculas aromáticas pequeñas, macromoléculas (como polímeros naturales o sintéticos) o nanopartículas altamente cargadas. La unión de dichas moléculas se forma debido a interacciones π - π , interacciones CH- π , interacciones OH- π , interacciones catión- π e interacciones hidrofóbicas (Baskaran, Mays & Bratcher, 2005).

Entre los polímeros orgánicos más empleados para la funcionalización de los CNT se encuentran el polietilenglicol, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el ácido fólico y el ácido hialurónico (HA). Es importante tener en cuenta que una estrategia eficaz para aumentar la especificidad del nanovector hacia el objetivo terapéutico consiste en la funcionalización de los CNT con moléculas de ligando que se unan a los receptores sobre-expresados en el blanco de interés (Salas et al., 2017).

Biodireccionamiento

El receptor CD44 es una glucoproteína transmembrana que se ha encontrado que se sobre-expresa en las células tumorales y su ligando principal es el HA. La sobre expresión de este receptor se relaciona con etapas agresivas de diversos tipos de cáncer (Orian V., 2010). La activación de dicho receptor induce la proliferación, adhesión, migración y supervivencia de las células tumorales (Chen et al., 2018).

Biodistribución y Toxicidad de los CNT

La biodistribución de los CNT depende de la vía de administración y de las propiedades físicoquímicas de los CNT tales como su tamaño, forma, agregación, modificaciones en la superficie y composición química.

En estudios *in vivo*, se ha demostrado la biodistribución de los CNT mediante diversas técnicas, entre ellas destacan la administración en ratones vía intravenosa (i.v) e intraperitoneal (i.p.) de CNT radiomarcados con itrio⁸⁶, mostrando una acumulación de estas nanopartículas en riñón, hígado, bazo y en menor medida en hueso (McDevitt et al., 2007)

La nanotoxicología se encarga de estudiar los efectos adversos de los nanomateriales en organismos vivos (Oberdörster et al., 2005), por lo que es necesario conocer la toxicidad de los CNT debido al empleo cada vez mayor de éstos como sistemas de entrega de fármacos, en especial en terapias anticancerígenas.

Se ha comparado a los CNT con el asbesto debido a sus similitudes morfológicas, se demostró que al administrar CNT de al menos 15 µm de longitud por vía i.p. se presentaba una inflamación mesotelial similar a la producida por el asbesto (Poland et al., 2008), mientras que los CNT más cortos no mostraron un efecto patológico. Se ha descrito además que la longitud mayor de los CNT produce reacciones pro

inflamatorias debido a una dificultad para fagocitar estas nanopartículas, impidiendo su eliminación (Yamashita et al., 2010).

Los CNT sin funcionalizar forman agregados que afectan su forma y el área de superficie disponible para su interacción molecular. También se demostró que estos agregados tóxicos pueden producir fibrosis, lesiones granulomatosas y estrés oxidativo (Murray et al., 2012).

Otro aspecto importante a considerar es la complejidad de las paredes de los CNT. Los SWCNT causan un efecto proinflamatorio, signos de necrosis y degeneración a bajas dosis, mientras que los MWCNT mostraron un efecto similar, pero en dosis mayores al administrarlos a macrófagos alveolares *in vitro* (Jia et al., 2005).

Se ha descrito que la administración de MWCNT vía i.p. en ratas, no induce respuesta carcinogénica, en al menos un período de 2 años (Muller et al., 2009).

Biodegradación

Debido a que los CNT tienen un gran potencial como nanoacarreadores de fármacos para aplicación biomédica, es fundamental conocer su biodegradación. Se conoce que los CNT pueden degradarse *in vitro* mediante la administración del método enzimático que involucra la aplicación de la enzima peroxidasa de rábano picante en presencia de H₂O₂ (Allen et al., 2008). La biodegradación por este método enzimático se vuelve más eficaz al añadir grupos funcionales a los CNT. Bajo estas condiciones se evidenció una alta tasa de degradación de los CNT en un período de 30 días (Russier et al., 2010).

De igual manera, se demostró que una peroxidasa similar, pero de humano también es capaz de degradar los CNT. Se empleó la mieloperoxidasa de los neutrófilos y macrófagos humanos para catalizar la biodegradación de los CNT demostrando una degradación radical de estas nanopartículas (Kagan et al., 2010).

Este efecto de la degradación de los CNT *in vitro* se ha replicado en experimentos realizados *in vivo*, en los cuales se administraron CNT en ratones *knock out* para la mieloperoxidasa, y se observó una pobre degradación de los CNT administrados a estos ratones en comparación con los ratones silvestres (Shvedova et al., 2012). Esto demuestra el importante papel que representa la mieloperoxidasa para la biodegradación de estas nanopartículas.

Antecedente directo

Existe un antecedente directo en nuestro laboratorio de la síntesis y caracterización de un nanovector funcionalizado con HA y cargado con CPT, que demostró presentar actividad citotóxica contra células tumorales murinas TC-1 (Salas et al., 2019).

Primero se caracterizaron las diferentes modificaciones de los CNT para determinar su composición orgánica cuantitativa y semicuantitativa mediante los métodos de termogravimetría (TGA) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), respectivamente.

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de los cCNT y de los nanotubos oxidados con ácidos fuertes y funcionalizados con HA (oxCNTHA). Se determinó la característica espectral en los oxCNTHA en el número de onda de 1400-1800 cm^{-1} . En dicha región se visualizó un pico característico en la región cercana al número de onda de 1700 cm^{-1} , que corresponde al grupo carboxilo de la amida I del HA lo que indica una correcta funcionalización. Además, en el espectro se visualizan picos en los números de onda de 1584 cm^{-1} y 1498 cm^{-1} debido al estiramiento y vibración de CH del HA. No se observaron estos patrones espectroscópicos en los cCNT (Figura 2A).

En las curvas obtenidas por TGA se observa una pérdida de peso leve y uniforme del 2-3% correspondiente al agua fisisorbida a temperatura de hasta 110 °C. La contribución de los restos oxidados unidos covalentemente a cCNT se estimó en un

porcentaje de aproximadamente 2-3% para oxCNT, se puede ver una mayor pérdida de peso (aproximadamente 1%) después de 440° C para oxCNT y esto puede estar relacionado con una descomposición gradual de las paredes oxidadas; el peso perdido es de aproximadamente 1%, lo que indica que el porcentaje de oxidación en MWCNT ya no es de 3%.

En el caso de las muestras de oxCNTHA el análisis termogravimétrico indica una pérdida de peso de aproximadamente el 10% relacionada con la descomposición de los restos orgánicos del HA y los MWCNT. La descomposición total del HA se puede observar a 366°C, en la cual la pérdida de peso abrupta de aproximadamente 2.5% (Figura 2B). Con esto se determinó, que con el proceso de síntesis empleado se obtuvieron construcciones de CNT con diferente composición química, debido a cada una de las modificaciones realizadas en ellos y necesarias para el objetivo del diseño del nanovector.

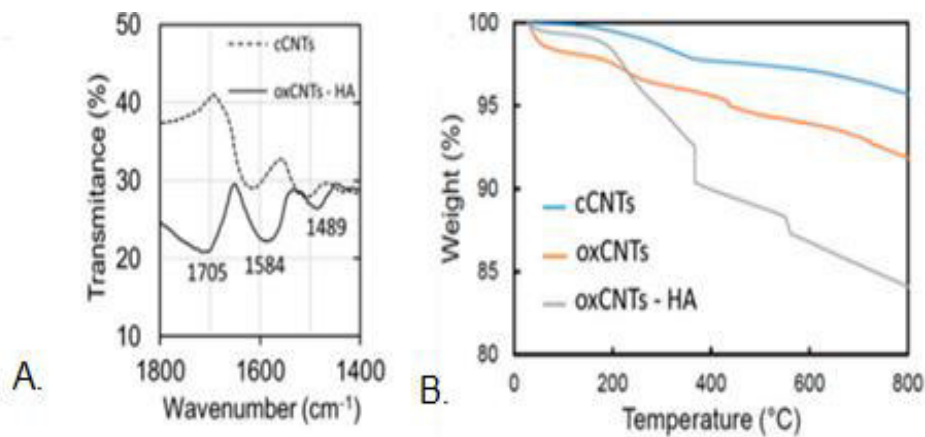


Figura 2. Caracterización del nanovector. A. Espectroscopía infrarroja. La línea punteada corresponde al espectro de los cCNT. La línea continua corresponde al espectro del oxCNTHA. B. Termogravimetría. La línea azul representa a los cCNT, la línea naranja a los oxCNT y la línea gris a los oxCNTHA. Salas, D., et al. (2019). "Physical characterization for as prepared nanovectors".

Una vez sintetizados y caracterizados los CNT se administraron cCNT y oxCNTHACPT a células tumorales murinas TC-1 y a células no tumorales 3T3. Se observó que ambos tipos celulares endocitan los cCNT de manera similar, sin embargo, esto cambia al administrar el oxCNTHACPT, que es endocitado en mayor medida por las células tumorales TC-1 debido al biodireccionamiento del nanovector hacia células tumorales y a la sobreexpresión del receptor CD44. Esto se observó mediante cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y se confirmó con microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figura 3).

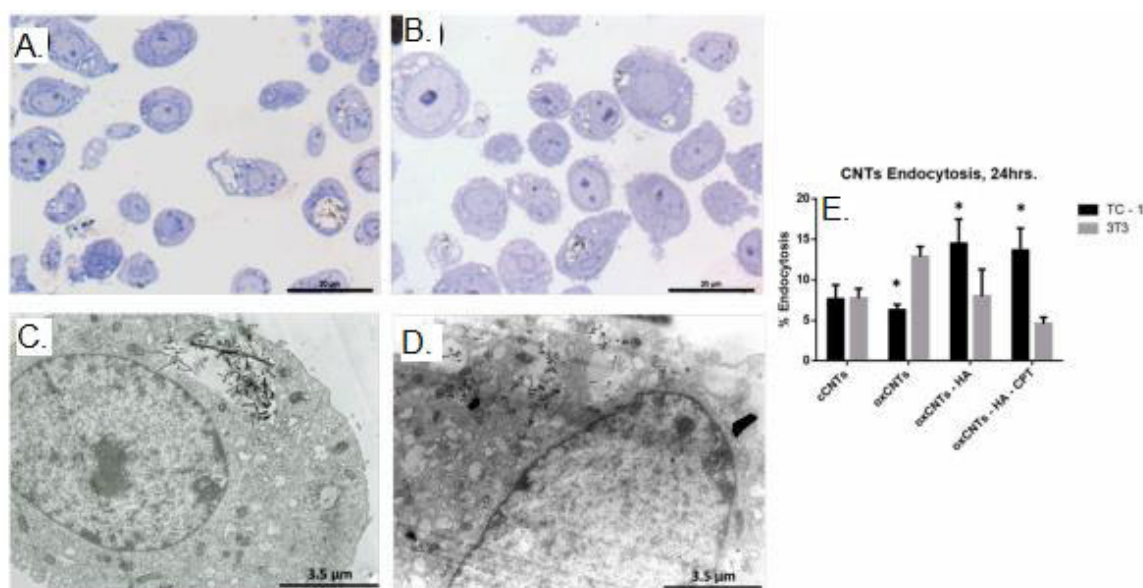


Figura 3. Endocitosis del nanovector. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de células TC-1 tratadas con A. cCNT. B. oxCNTHACPT. Micrografías electrónicas de transmisión de células TC-1 tratadas con C. cCNT. D. oxCNTHACPT. E. Cuantificación del índice de endocitosis de las diferentes modificaciones de CNT en células TC-1 y 3T3. Salas, D., et al. (2019). “Nanovectors cell uptake”.

Por último se realizaron ensayos de MTT *in vitro* en células tumorales TC-1 y 3T3 las cuales fueron expuestas por 24 h a los tratamientos con cCNT, oxCNTHACPT y la droga CPT con el propósito de determinar la citotoxicidad de cada tratamiento. Se obtuvo que el nanovector presentó poco efecto citotóxico en células no tumorales 3T3, mientras que en las células tumorales TC-1 el nanovector mostró un efecto citotóxico dependiente de la dosis, incluso mayor que el efecto citotóxico observado al administrar el CPT (Figura 4).

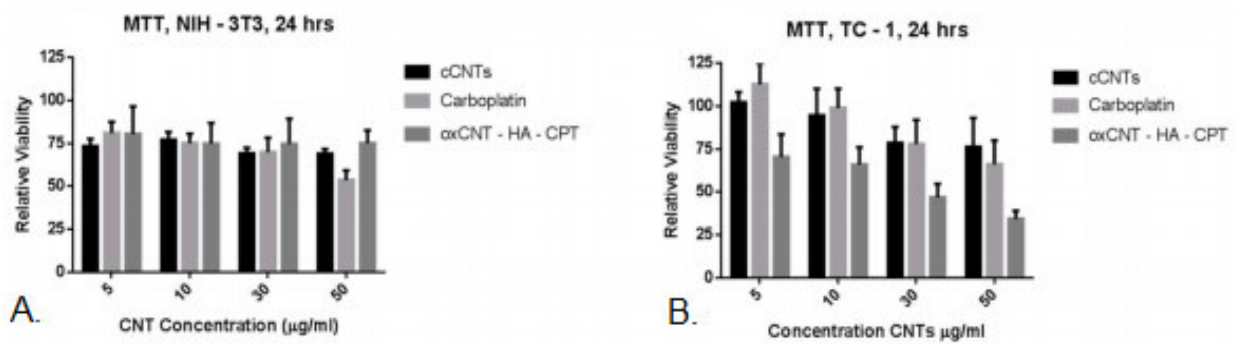


Figura 4. Citotoxicidad del nanovector. A. Ensayo de citotoxicidad con MTT en células no tumorales 3T3. B. Ensayo de citotoxicidad con MTT en células tumorales TC-1. Salas, D., et al. (2019). "Citotoxicity induced by nanovectors".

Los resultados obtenidos en ese estudio son prometedores, demostrando que, al menos en ensayos *in vitro* en células murinas, el nanovector presenta efecto citotóxico selectivo contra las células tumorales (Salas et al., 2019).

Justificación

La quimioterapia a base de compuestos platinados, como el CPT, presenta baja selectividad y provoca efectos tóxicos en los pacientes.

Los CNT presentan un gran potencial como sistema de entrega de fármacos, debido a su capacidad de biodirigirlos hacia células tumorales.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un nanovector grafénico funcionalizado con HA y cargado con CPT el cual mostró actividad citotóxica contra células tumorales murinas.

Ya que existe la necesidad de generar nuevas estrategias terapéuticas antineoplásicas, es necesario demostrar si este efecto citotóxico se presenta en células tumorales humanas.

Hipótesis

El nanovector grafénico funcionalizado con HA y cargado con CPT tiene actividad citotóxica contra células tumorales humanas *in vitro*.

Objetivo General

Demostrar que el nanovector grafénico funcionalizado con HA y cargado con CPT tiene actividad citotóxica contra células tumorales humanas *in vitro*.

Objetivos Específicos

1. Generar el nanovector grafénico funcionalizado con HA y cargado con CPT.
2. Determinar la presencia del receptor CD44 en las líneas celulares.
3. Determinar si el nanovector muestra un efecto citotóxico en células tumorales humanas *in vitro*.
4. Analizar la eficacia del nanovector cargado con CPT sobre células tumorales humanas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material y equipo

Reactivos:

Ácido Sulfúrico concentrado (CTR SCIENTIFIC, # 01036)

Ácido Nítrico concentrado (J. T. BAKER. # 7697-37-2)

Ácido Clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC, #817-14)

Dimetil Sulfóxido (EMPLURA ®, # 67-68-5))

N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (SIGMA-ALDRICH, #25952-53-8)

N-Hidroxisuccinimida (SIGMA-ALDRICH, # 6066-82-6)

Polietilenimina (SIGMA-ALDRICH, # 9002-98-6)

Ácido Hialurónico (SIGMA-ALDRICH, #9067-32-7)

Carboplatino (SIGMA-ALDRICH, #41575-94-4)

Anticuerpo primario anti CD44

Anticuerpo Secundario Conjugado con Alexa Fluor 568 (INVITROGEN, #623962)

Azul de Tiazolilo Bromuro de Tetrazolio (SIGMA-ALDRICH, # 298-93-1)

Nonidet-P40 (PROBIOTEK, #9016-45-9)

PBS 1x

TBST 1x

Soluciones

Medio de Cultivo Advanced DMEM 1x (gibco, # 12491-015)

Acetato de etilo (CTR Scientific, # 00204)

Alcohol etílico 100% (CTR Scientific, # 64-17-5)

Alcohol metílico 100% (CTR Scientific, # 01208)

2-Propanol 100% (J.T. Baker, #9084)

Equipo

Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 2 μ l (Labnet)

Tubos cónicos de 15 y 50 ml (Eppendorf)

Microplacas tratadas de 24 y 96 pozos (NEST)

Frascos tratados para cultivo celular de superficie de T25 y T75 cm^2 (NEST)

Vortex (Daigger)

Báscula Analítica (AND)

Lector de placas (Bio-Rad, i Mark Microplate Reader)

Microscopio de Fluorescencia (Leica DM100)

Microscopio Electrónico de Transmisión (Carl Zeiss EM-109)

Cámara Infinity

Equipo de sonicación Transsonic T420 (Elma)

Centrífuga 5415C (Eppendorf)

Agitador Digital (Cimarec Thermo Scientific)

Agitador orbital con control de temperatura (MRC)

Cámara Q Imaging

Centrífuga SORVALL ST16 (Thermo Scientific)

Contador Automatizado de Células TC20 (BIO-RAD)

Métodos

Síntesis del Nanovector gráfenico funcionalizado con HA y cargado con CPT

Los MWCNT recubiertos con grupos -COOH fueron adquiridos de la casa comercial Nanoamor® (Stock #1245YJF, CAS #99685-96-8).

Para el proceso de oxidación de los cCNT se pesaron 50 miligramos (mg) de cCNT, los cuales se pusieron a reaccionar con 12 mililitros (ml) de H₂SO₄ y 4 ml de HNO₃. Se pusieron en baño de ultrasonido a nivel 15 por 1 hora (h) y posteriormente en agitación magnética (STIR: 6) por 24 h. Con estas reacciones se obtuvieron los CNT oxidados (oxCNT), a los cuales se les realizaron lavados con agua destilada hasta neutralizar su pH a 7. Posteriormente, los oxCNT se resuspendieron en acetona concentrada y se dejaron secando en el horno a 60°C por 48 h para su posterior recuperación tras la evaporización de la acetona.

Una vez obtenidos los oxCNT se siguió con el proceso de funcionalización, para ello se pesaron 30 mg de oxCNT y se pusieron a reaccionar con 12.5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en baño de ultrasonido a nivel 15 por 30 minutos (min). Posteriormente, se preparó una solución activadora con 30 mg de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro (EDC-HCL) y 15 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 1.25 ml de DMSO que se dejó en agitación magnética (6 STIR) por 30 min. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones y se dejaron

en agitación magnética por 3 h. Una vez concluido el tiempo de reacción, se añadieron 30 mg de polietilimina (PEI) a la solución que contiene los oxCNT y se dejó en agitación magnética a 6 STIR por 48 h. Con estas reacciones, se obtuvieron oxCNT funcionalizados con PEI (oxCNTPEI). Pasado el tiempo se realizaron lavados con agua destilada y se dejaron secar por 48 h para posteriormente recuperarlos. Una vez recuperados, se tomaron 20 mg de los oxCNTPEI y se disolvieron en 8 ml de DMSO mediante baño de ultrasonido (a nivel 15 y agitación magnética a 6 STIR por 30 min. En seguida, se preparó una solución activadora con 20 mg de EDC-HCL y 10 mg de NHS en 0.8 ml de DMSO que se dejó en agitación magnética a 6 STIR por 30 min. La solución activadora se añadió a la solución con los nanotubos y se dejó reaccionando por 3 h en agitación magnética a 6 STIR. Se dispuso de una solución de 20 mg de HA en 1.5 ml de DMSO a la que se activó con una solución de 20 mg de EDC-HCL en 0.8 ml de DMSO. Posteriormente, se añadió la solución activada de HA a la solución con oxCNTPEI y se dejó en reacción por 48 h en agitación magnética a 6 STIR. Pasado el tiempo, se realizaron lavados con agua destilada y se dejaron secar por 48 h para su posterior recuperación. Una vez secos, a los oxCNTHA se les realizó el proceso de internalización del CPT mediante el método de nanoextracción, para ello, se añadió 5 mg de oxCNTHA y 5 mg de CPT en 2 ml de acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) y se dejó en agitación magnética a 6 STIR por 24 h en oscuridad. Posteriormente, se realizaron lavados con una solución de $C_4H_8O_2$, etanol (C_2H_5OH) y agua destilada en una relación de 3:1:1 y se dejaron secar por 48 h para su posterior recuperación, obteniendo así los nanotubos funcionalizados cargados con CPT (oxCNTACPT).

Caracterización de cCNT y oxCNTACPT

La morfología de los cCNT y oxCNTACPT fue analizada por MET con un microscopio Carl Zeiss EM-109 a 80 KV, las muestras se prepararon dispersando los nanotubos en DMSO en un baño de ultrasonido durante 30 min, se depositaron sobre rejillas de soporte Lacey cubiertas con carbón con contraste de cloruro de oro al 1%. Se obtuvieron micrografías de los nanotubos a 20000x.

Establecimiento de las líneas celulares:

Para analizar el efecto citotóxico *in vitro* del nanodispositivo grafénico modificado con HA y cargado con CPT se emplearon tres líneas celulares:

- Línea celular HeLa: Células derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano de un paciente femenino de 31 años de edad y de raza negra. Son células adherentes, de morfología epitelial y positiva para queratina por tinción de inmunoperoxidasa. Contienen secuencias del virus del papiloma humano tipo 18, así como también expresan niveles bajos de p53 y niveles normales de proteína de retinoblastoma (pRB) (ATCC®, CCL-2™).
- Línea celular MDA-MB-231: Células derivadas de adenocarcinoma mamario humano de un paciente femenino de 51 años de edad y de raza caucásica. Son células adherentes, de morfología epitelial y expresan el oncogén WNT7B. Expresan EGF y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (ATCC®, HTB-26™).
- Línea celular NIH-3T3: Fibroblastos embrionales de ratón. Son células adherentes y de morfología ahusada. Adecuadas para transfecciones, sin embargo, en este estudio se emplearon para demostrar susceptibilidad a los oxCNTHACPT (ATCC®, CRL-1658™).

Todas las líneas celulares se incubaron en medio Advanced DMEM 1X suplementado con 4% v/v de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomina a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%.

Inmunofluorescencia para la determinación de CD44

Para este ensayo se emplearon la línea celular no tumoral NIH-3T3 y las líneas celulares tumorales HeLa y MDA-MB-231. A ellas se les realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia del receptor CD44.

Para ello se cultivaron 5×10^4 células en placas de 24 pozos que contenían un cubreobjetos redondo en el fondo de cada pozo y se dejaron las células en incubación por 24 h. Posteriormente, se fijaron las células con metanol concentrado durante 20 min a 4°C. Se retiró el medio de cada pozo, se realizaron lavados con tampón fosfato salino (PBS 1X) y se realizaron lavados con solución salina tamponada con Tris, Tween 20 (TBST) y PBS. Una vez realizados los lavados, se bloquearon antígenos con suero de caballo al 10% por 1 h a temperatura ambiente (TA). Pasado el tiempo se añadió el anticuerpo primario anti-CD44 y se incubó por 24 h a 4°C. Después se realizaron lavados con TBST y se añadió 100 μ l del anticuerpo secundario (cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 568) y se incubó por 2 h a TA y en oscuridad. Posteriormente se realizaron lavados con TBST y se añadieron 200 μ l de DAPI para el contraste de núcleos. Se dejaron en incubación con DAPI por 30 min a TA, y posteriormente los cubreobjetos se montaron con glicerol en portaobjetos. Finalmente, se analizaron mediante el microscopio de fluorescencia.

Ensayos con MTT

Para la determinación del crecimiento y viabilidad celular se empleó el ensayo con Bromuro de tiazolil tetrazolium azul (MTT), el cual se fundamenta en la reducción del MTT a sales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales como la succinato-deshidrogenasa, e indica la viabilidad celular indirecta al medir la función mitocondrial. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas (abcam, ab211091, 2020). Para ello, se incubaron 7,500 células por pozo en 100 μ l de medio de cultivo completo en una placa de 96 pozos y las células se dejaron en adherencia durante 24 h. Posteriormente se les retiró el medio y se añadieron 100 μ l de medio de cultivo completo con los tratamientos (cCNT, oxCNT, oxCNTHA y oxCNTHACPT) y se incubaron por 24 h. Los tratamientos se administraron en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 μ g/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos por 12, 24, 48 y 72 h.

Pasado el tiempo se agregaron 15 µl de la solución de MTT (3 mg/ml) a cada pozo y se incubaron por 3.5 h a 37°C. Después se retiró el medio y se agregaron 150 µl del revelador de MTT (4mM HCl, 0.01% NP40 en isopropanol). Se cubrieron las placas con papel aluminio y se pusieron a agitación en un agitador orbital durante 15 min. Terminado el tiempo se realizó la lectura de la absorbancia a 590 nm.

Ensayos de contraste de núcleos con DAPI

Para los ensayos de contraste de núcleos con DAPI, se incubaron 7,500 células por pozo con medio de cultivo completo (100 µl por pozo) en una placa de 96 pozos. Las células se dejaron en adherencia durante 24 h y posteriormente se les retiró el medio; en seguida se añadieron 100 µl de medio de cultivo completo con los tratamientos (cCNT, oxCNT, oxCNTHA y oxCNTHACPT) y se incubaron por 24 h. Pasado el tiempo, se les retiró el medio con tratamiento y se realizaron lavados con PBS 1X. Posteriormente se fijaron las células con metanol-acetona en relación 1:1 a 4°C durante 20 min. Después de la fijación se realizaron lavados con PBS 1X, se añadieron 100 µl de DAPI (1 µl de 1 mg/ml) y se dejó incubando a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo se observaron las placas en el microscopio de fluorescencia.

Ensayos con MTT

Con el propósito de determinar la eficacia del nanovector se empleó el ensayo con MTT descrito previamente en las células expuestas a los tratamientos con oxCNTHACPT y CPT durante 24 h.

Ensayos de contraste de núcleos con DAPI

En este objetivo se utilizó la metodología descrita previamente en las células expuestas a los tratamientos con oxCNTHACPT y CPT durante 24 h. Posteriormente se lavaron, fijaron, contrastaron con DAPI y se analizaron con el microscopio de fluorescencia.

4. RESULTADOS

La oxidación y funcionalización induce cambios en la pared de los cCNT.

Para la generación del nanovector (oxCNTHACPT) se reprodujo la metodología empleada por Salas et al., (2019) quienes diseñaron el nanovector grafénico funcionalizado con HA y cargado con CPT que demostró actividad citotóxica contra células tumorales murinas.

Tras la generación del nanovector se realizó la caracterización tanto de cCNT como del oxCNTHACPT, para ello se empleó la técnica de MET en donde se analizaron cambios en la electrodensidad de sus paredes, organización de los nanotubos y visualización del lumen de los mismos.

En los cCNT se observó cómo estas nanopartículas están mal organizadas y forman aglomeraciones, esto se debe a la falta de funcionalización de las mismas. De igual manera gran parte de los cCNT presentan un patrón enrollado, es decir que se doblan sobre su eje. Al observar las paredes de cada cCNT, estas se visualizan electrodensas y de poco grosor y en su interior de los cCNT se visualiza un lumen que luce vacío (Figura 5).

En los oxCNTHACPT se observó que dichos nanovectores se encuentran mejor dispersos comparados con los cCNT, lo cual se debe a que cada nanopartícula está más separada una de otra, además su disposición es más recta, lo que indica una buena solubilidad en medio acuoso. Al observar la pared de los oxCNTHACPT se evidencian unas paredes electrodensas y de mayor grosor comparado a los cCNT, lo cual es debido a la funcionalización de estos nanotubos. Además, al realizar un acercamiento al nanovector se visualiza un puntillado fino en su interior, que corresponde al CPT que se internalizó (Figura 6).

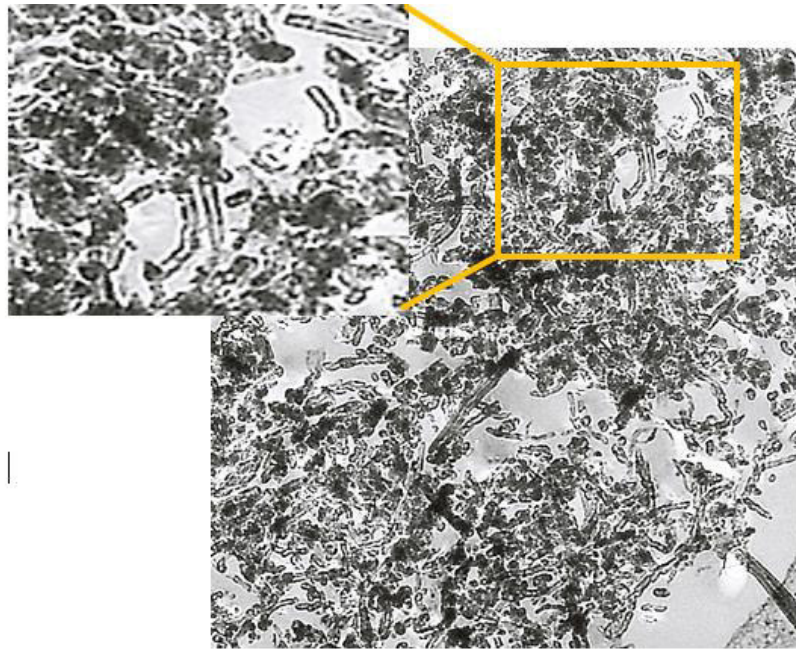


Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de los cCNT. Observe la desorganización y aglomeración de los nanotubos.

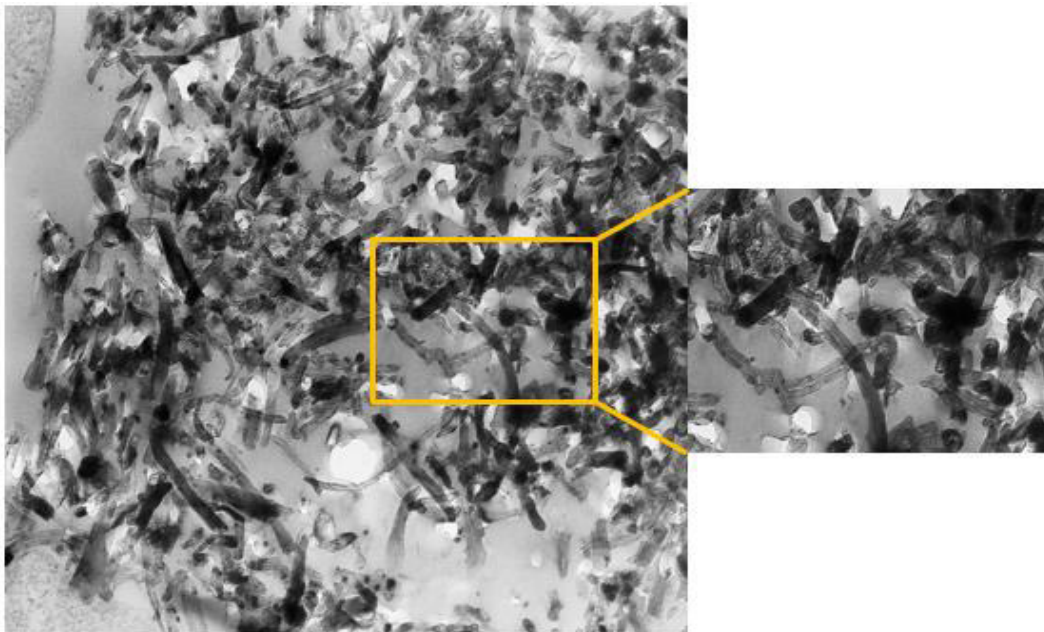


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de los oxCNTHACPT. Observe la mayor dispersión, aumento en la electrodensidad de las paredes y puntos electrodensos en el interior que corresponden al CPT.

Las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 muestran mayor expresión del receptor CD44 que las células no tumorales NIH-3T3.

Con el propósito de biodireccionar el nanovector hacia las células que sobreexpresan el receptor del HA (CD44), es decir, hacia células tumorales, es importante primero demostrar la presencia de dicho receptor en las líneas celulares empleadas en este proyecto. Para ello, se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta que se basa en el sistema de detección con fluorocromo para revelar la señal fluorescente positiva mediante microscopía de fluorescencia.

Se observa que la señal del receptor CD44 es apenas apreciable en las células no tumorales NIH-3T3. Mientras que en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 esta señal se aprecia con mayor intensidad, lo que indica mayor presencia del receptor CD44 en las células tumorales (Figura 7).

Con estos resultados se demuestra que en las líneas celulares tumorales empleadas para este proyecto existe mayor presencia del receptor CD44, en comparación con las células no tumorales. Esto es un factor de gran importancia para asegurar que el nanovector se dirija hacia las células tumorales.

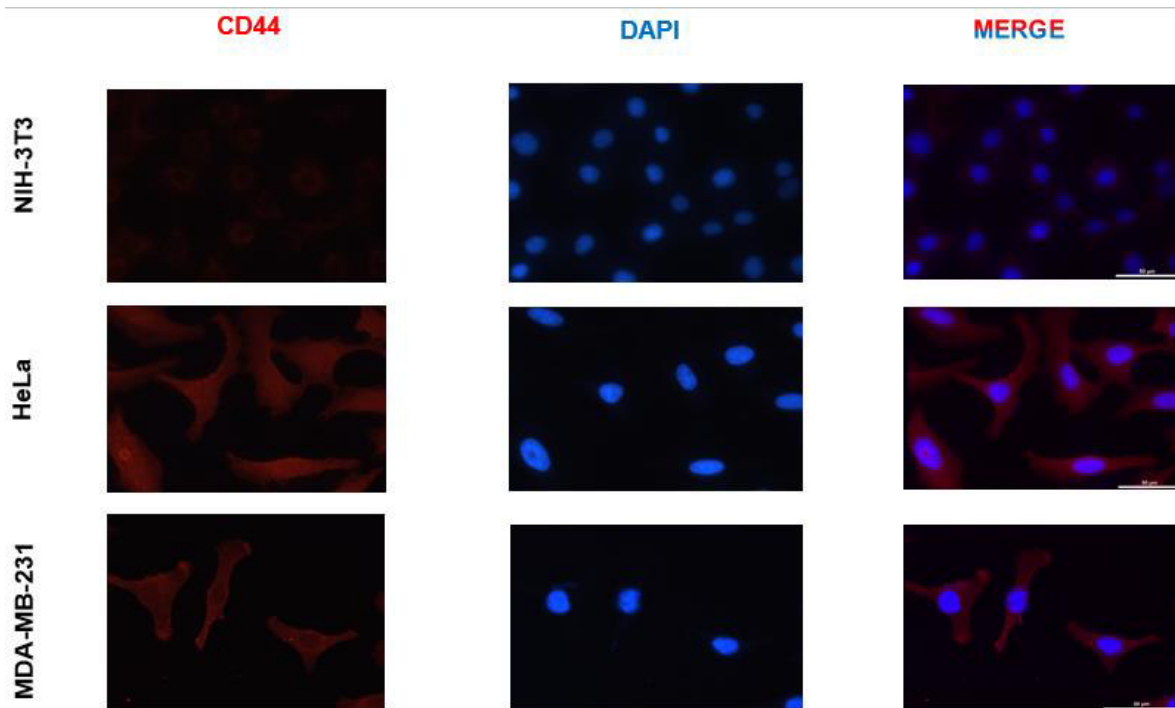


Figura 7. Expresión del receptor CD44. Se analizó la expresión en las líneas celulares NIH-3T3, HeLa y MDA-MB-231 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (n=3). Observe la mayor positividad al receptor CD44 en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231. 40X.

El nanodispositivo muestra mayor efecto citotóxico vs células tumorales y menor contra no tumorales.

Con el propósito de determinar la presencia de un efecto citotóxico del nanovector tanto en células tumorales como en células no tumorales, estas se trataron con cCNT, oxCNT, oxCNTHA, oxCNTHACPT y CPT a dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml durante 12, 24, 48 y 72 h, y posteriormente se evaluaron mediante MTT.

En las figuras 8 a la 17, se presentan microfotografías de campo claro de los cultivos celulares de NIH-3T3 y HeLa con los diferentes tratamientos y concentraciones expuestas por 24 h, y las cuales son representativas para los ensayos de citotoxicidad con MTT.

En los ensayos de viabilidad celular en células NIH-3T3 tratadas con cCNT se observó un efecto citotóxico de los cCNT ya que, a mayor concentración de estas nanopartículas, se observó una menor confluencia celular. Además, debido a que

los cCNT no están funcionalizados, se observa gran cantidad de aglomerados (Figura 8).

En los ensayos de NIH-3T3 tratados con oxCNT, se observó un menor efecto citotóxico de los oxCNT, ya que la confluencia celular no disminuyó en gran medida a una mayor concentración del tratamiento. Se debe notar que, con este tratamiento, hay menor cantidad de agregados, debido a la oxidación de los oxCNT (Figura 9).

Por otra parte, en los ensayos de NIH-3T3 tratados con oxCNTHA se observó también un menor efecto citotóxico. La confluencia celular no disminuyó en relación a la mayor concentración del tratamiento y debido a la funcionalización de los oxCNTHA, también se observó una menor cantidad de agregados de nanotubos (Figura 10).

En los ensayos de NIH-3T3 tratados con oxCNTHACPT, es importante notar que, con este tratamiento, a pesar de poseer el antineoplásico CPT en el interior de los nanotubos, no se observó un efecto citotóxico (Figura 11).

Finalmente, en los ensayos de NIH-3T3 tratadas con CPT, se nota como a mayor concentración, el CPT es citotóxico para las células no tumorales. El efecto citotóxico se observa como un cambio en la morfología celular y una disminución de su adherencia a la placa (Figura 12).

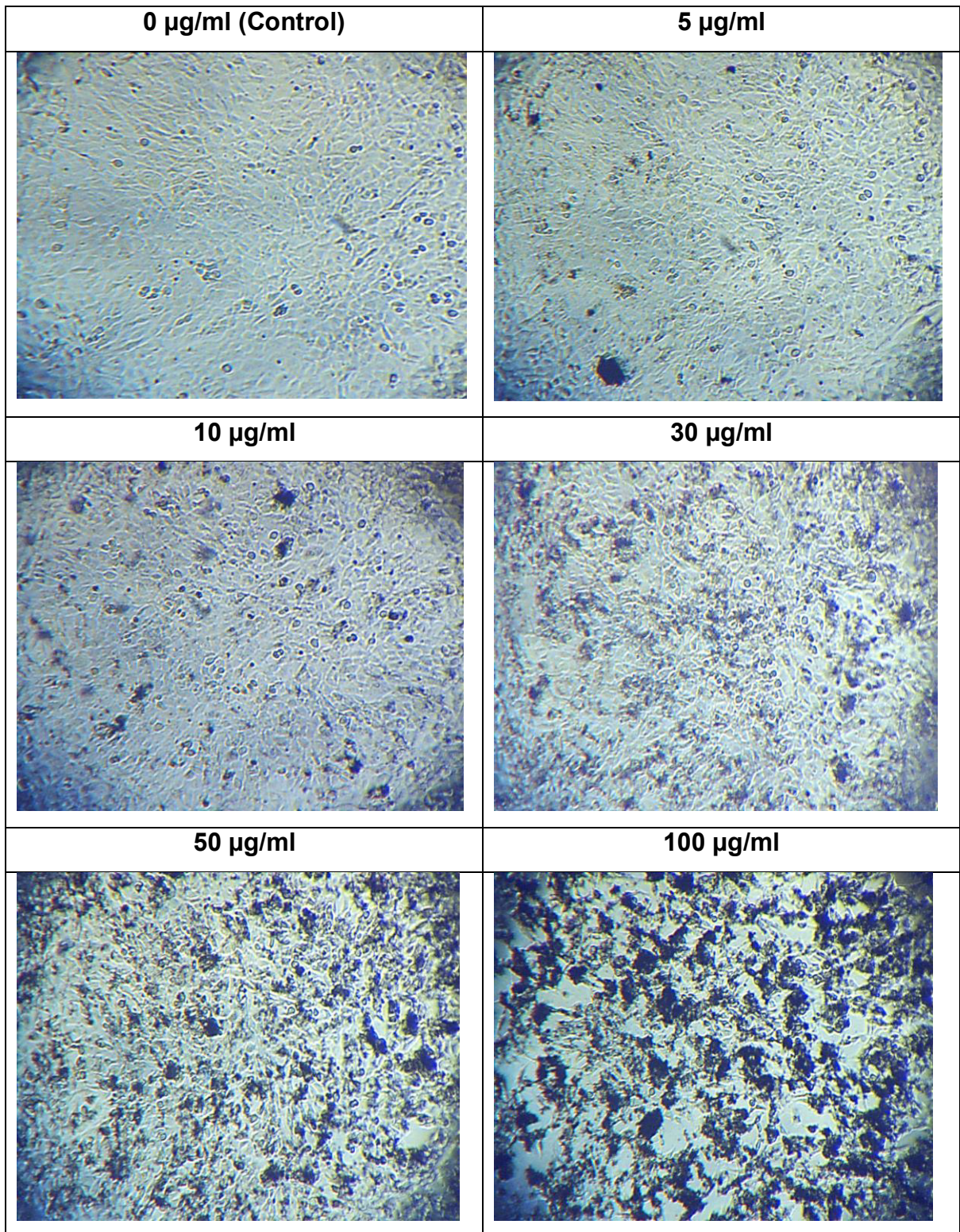


Figura 8. Células NIH-3T3 tratadas por 24 h con cCNT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración de cCNT, mayor aglomerado de las nanopartículas y menor confluencia celular.

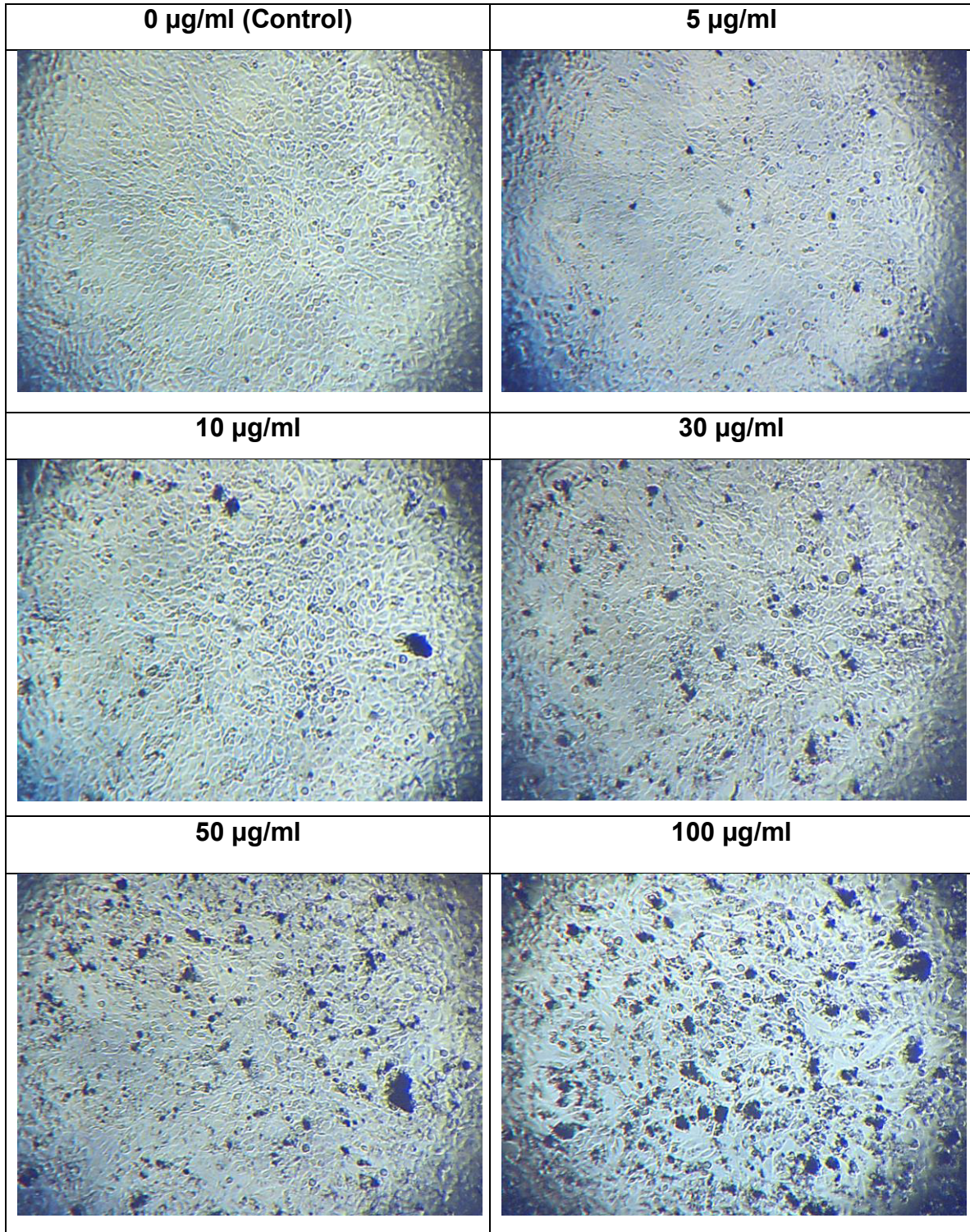


Figura 9. Células NIH-3T3 tratadas por 24 h con oxCNT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración del tratamiento con oxCNT, los aglomerados de nanopartículas son menos y la confluencia celular disminuye ligeramente.

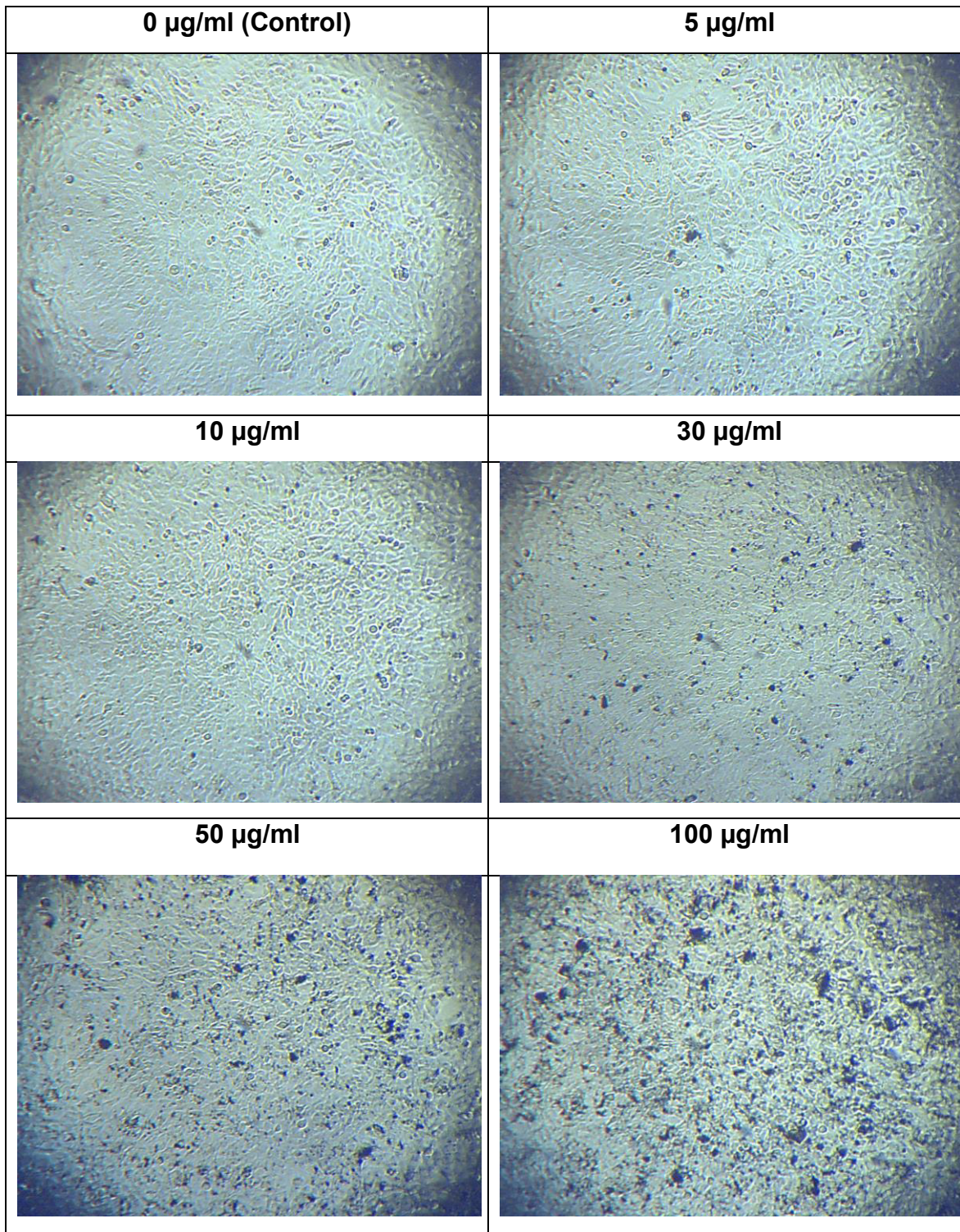


Figura 10. Células NIH-3T3 tratadas por 24 h con oxCNTHA. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Nótese que se forman menos aglomerados de nanopartículas a mayor concentración del tratamiento con oxCNTHA, así mismo la confluencia celular disminuye ligeramente.

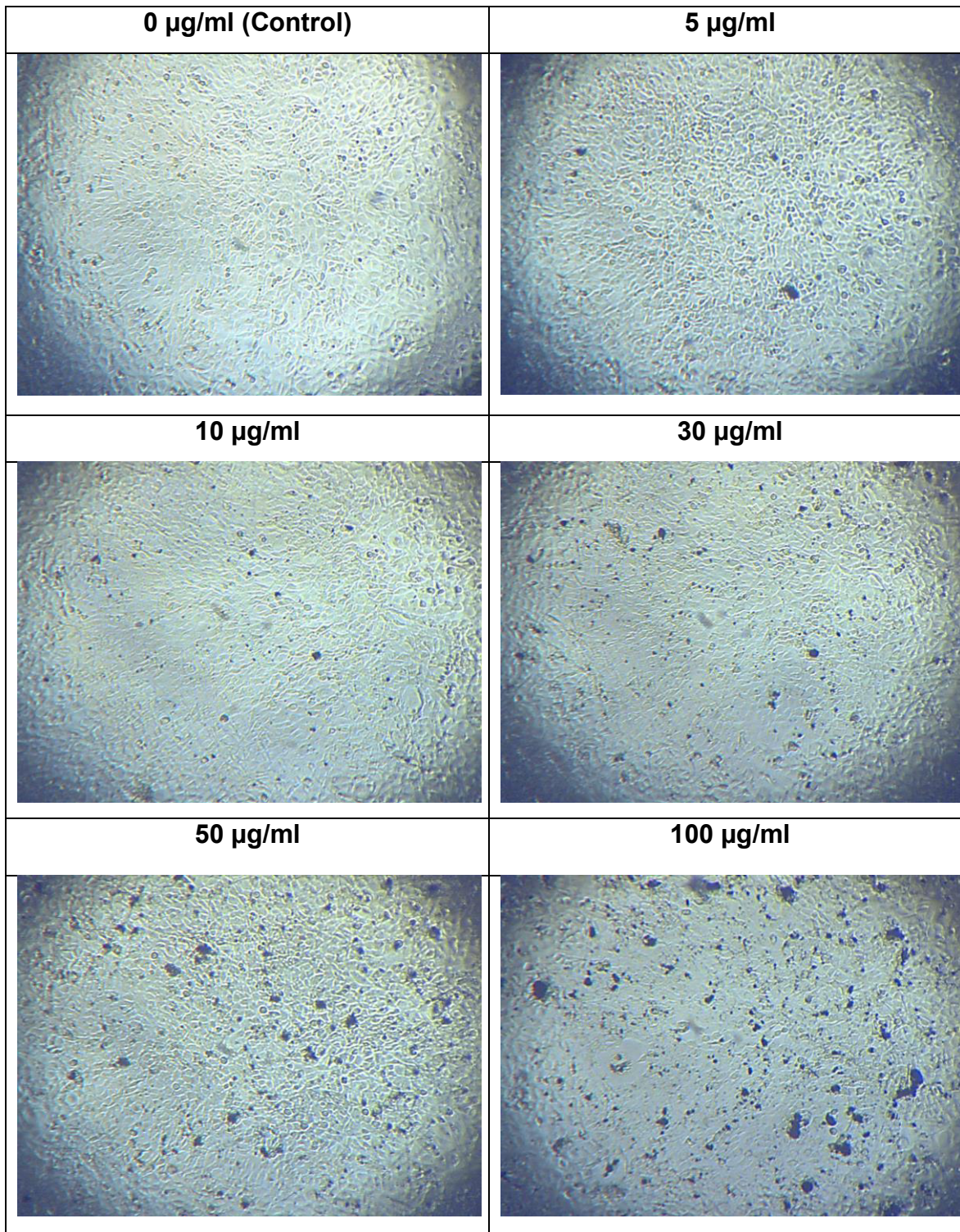


Figura 11. Células NIH-3T3 tratadas por 24 h con oxCNTHACPT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que no se forman tantos aglomerados de nanopartículas a mayor concentración del tratamiento, además la confluencia celular disminuye ligeramente.

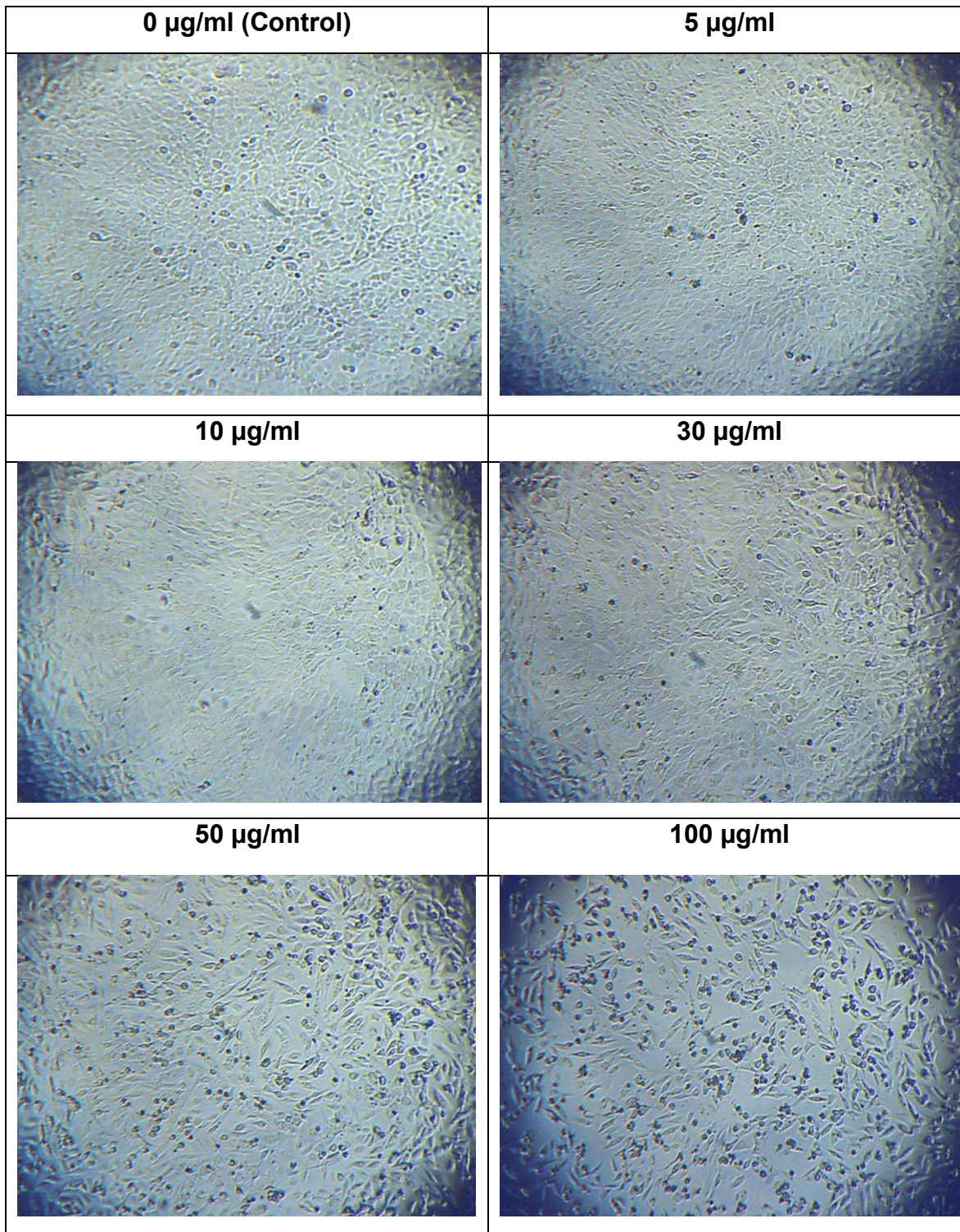


Figura 12. Células NIH-3T3 tratadas por 24 h con CPT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración del tratamiento, menor confluencia celular. Las células se desprenden del pozo debido a la citotoxicidad del tratamiento y cambian su morfología.

Al realizar los tratamientos en las células HeLa expuestas durante 24 h a los diferentes tratamientos y concentraciones, se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en las figuras 13 a 17.

En los ensayos de viabilidad celular en las células HeLa tratadas con cCNT, se observó un efecto citotóxico de los cCNT debido a que, a mayor concentración de estas nanopartículas, se observó una menor confluencia celular. Además, debido a que los cCNT no están funcionalizados, se observa una gran cantidad de aglomerados (Figura 13).

En contraste, en los ensayos de HeLa tratadas con oxCNT, se observó un menor efecto citotóxico de los oxCNT, ya que la confluencia celular no disminuyó en gran medida a mayor concentración del tratamiento. Se debe apreciar que, con este tratamiento, hay menor cantidad de agregados, debido a la oxidación de los oxCNT (Figura 14).

En el análisis de los ensayos de HeLa tratadas con oxCNTHA, también se observó un menor efecto citotóxico. La confluencia celular no disminuyó en relación a la mayor concentración del tratamiento. Se observa también una menor cantidad de agregados de nanotubos, debido a la funcionalización de los oxCNTHA (Figura 15).

Por otra parte, en los ensayos de HeLa tratadas con oxCNTHACPT es importante notar que, con este tratamiento, la citotoxicidad en las células tumorales es muy evidente a dosis crecientes. Observándose el efecto citotóxico como un cambio en la morfología celular y disminución en su adherencia al pozo (Figura 16).

Finalmente, en los ensayos de HeLa tratadas con CPT, se notó que a bajas dosis no es tan citotóxico para las células tumorales. Y aún con la mayor concentración del tratamiento (100 $\mu\text{g/ml}$) el efecto citotóxico es mínimo y se observa como un cambio en la morfología celular y una disminución de su adherencia al pozo (Figura 17). Se concluye que la oxidación y funcionalización disminuyen la citotoxicidad de los cCNT. Además la funcionalización le otorga biodireccionalidad al nanovector afectando selectivamente a las células tumorales.

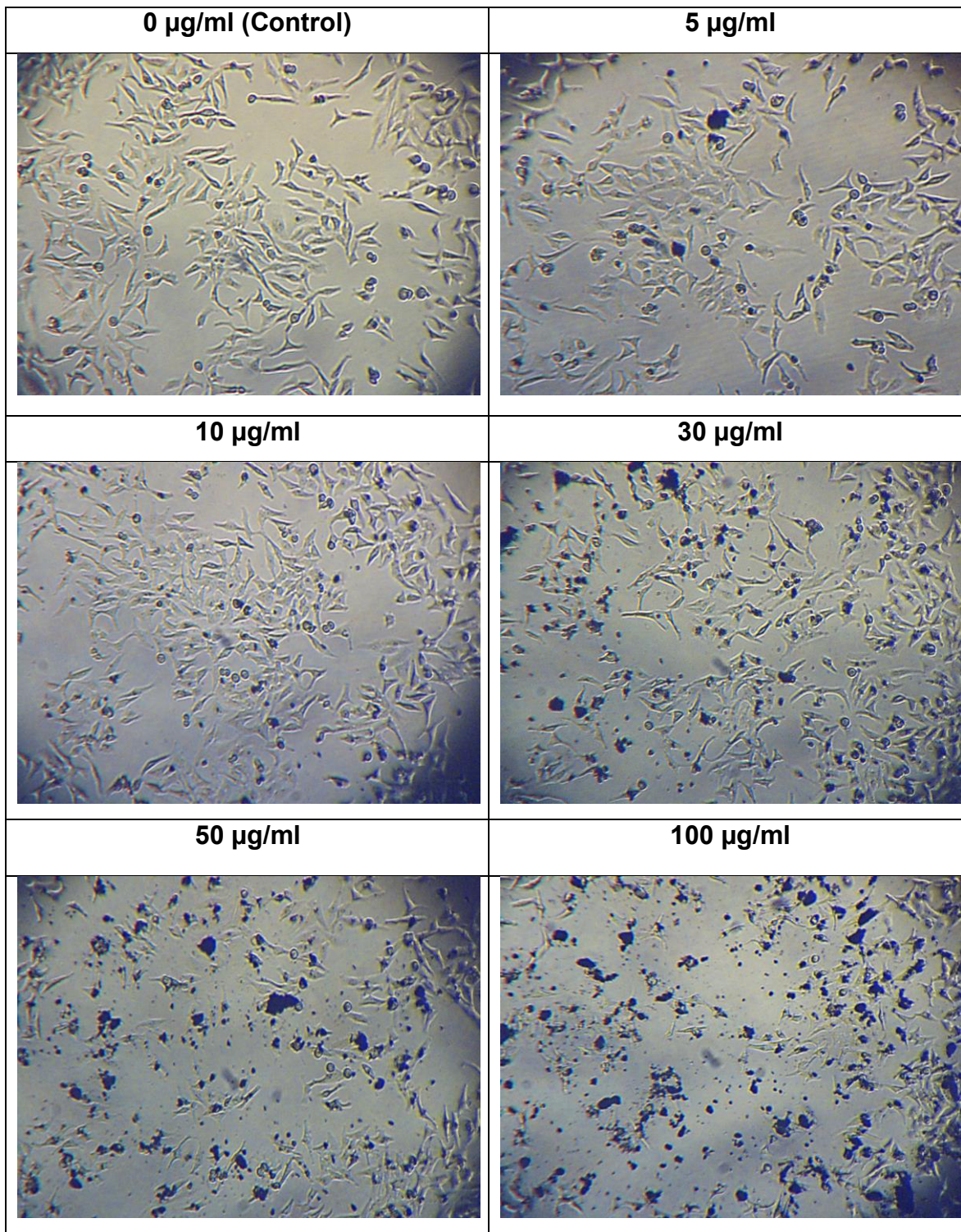


Figura 13. Células HeLa tratadas por 24 h con cCNT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración de cCNT, hay un mayor aglomerado de las nanopartículas y menor confluencia celular.

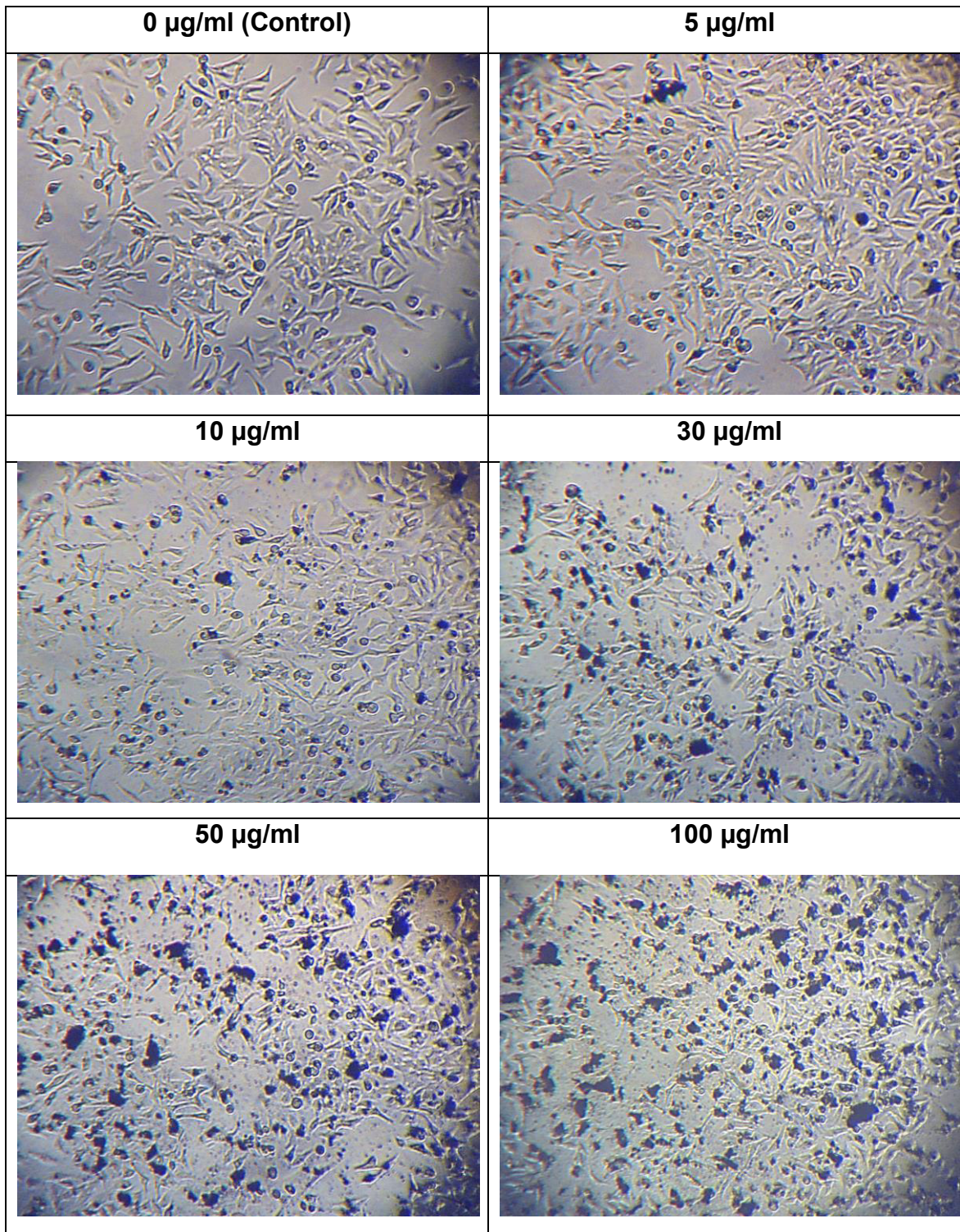


Figura 14. Células HeLa tratadas por 24 h con oxCNT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración del tratamiento con oxCNT, los aglomerados de nanopartículas son menos y la confluencia celular permanece.

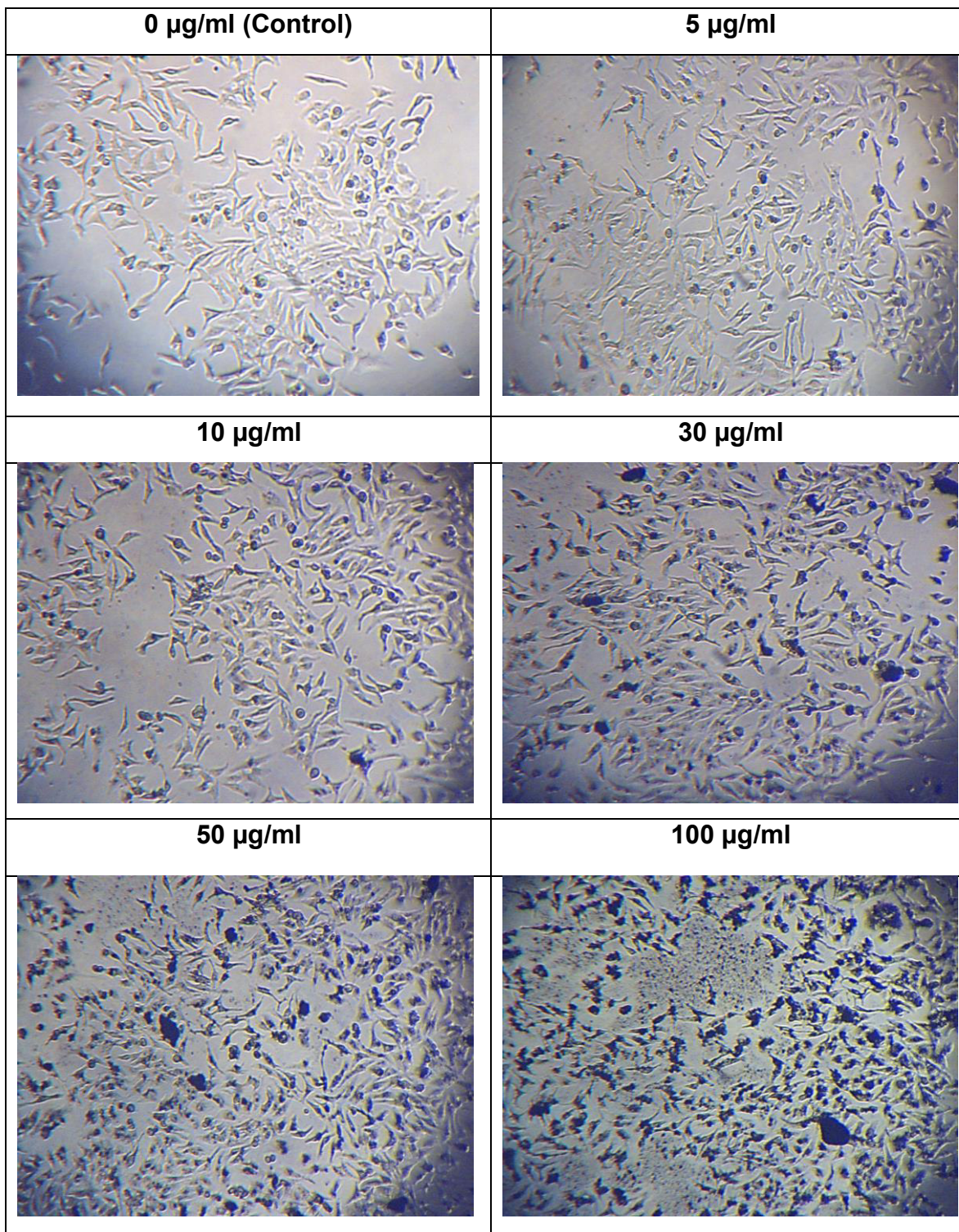


Figura 15. Células HeLa tratadas por 24 h con oxCNTHA. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Nótese que se forman menos aglomerados de nanopartículas a mayor concentración del tratamiento con oxCNTHA, así mismo la confluencia celular disminuye ligeramente.

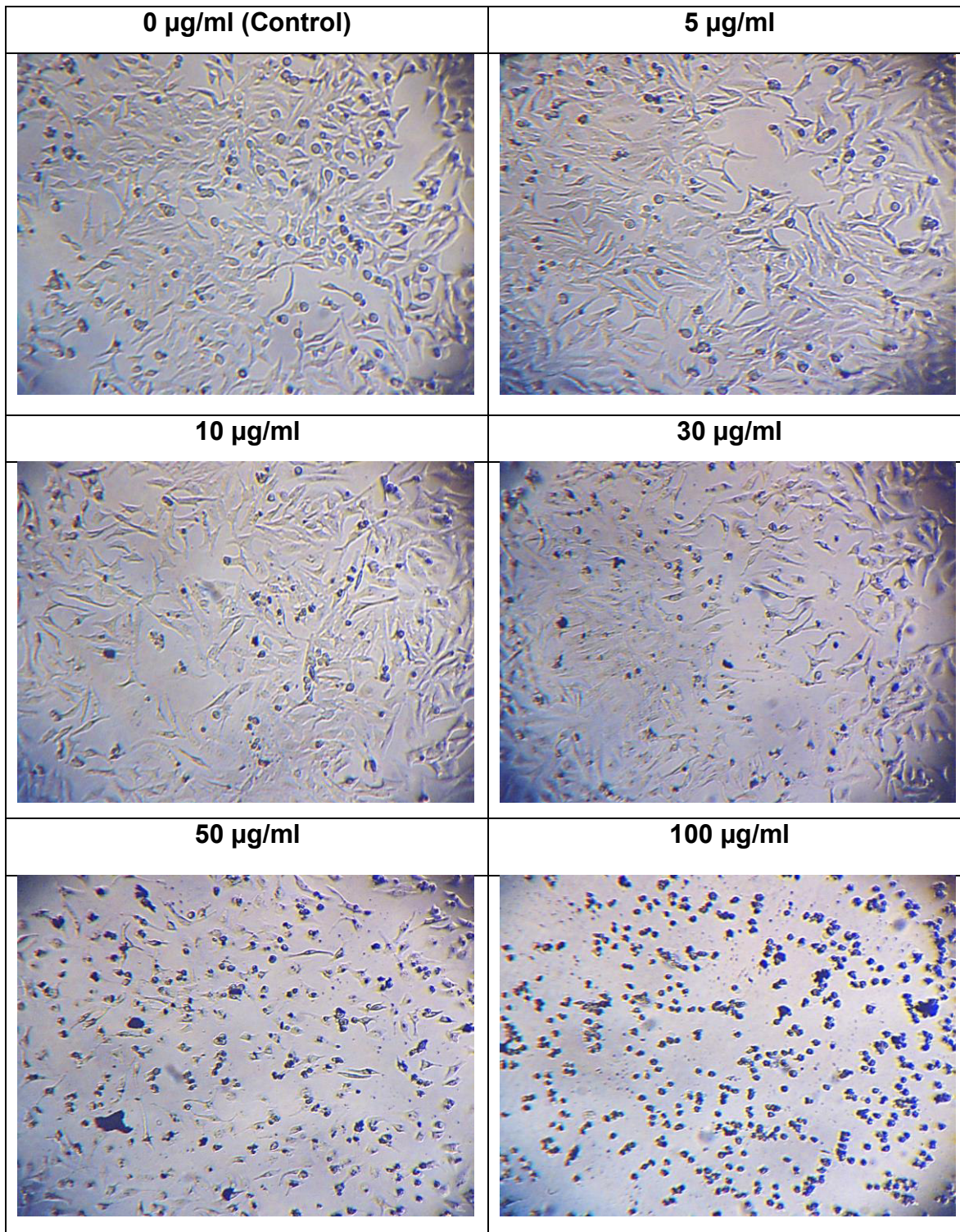


Figura 16. Células HeLa tratadas por 24 h con oxCNTHACPT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Obsérvese que a mayor concentración del tratamiento, menor confluencia celular. Las células se desprenden del pozo debido a la citotoxicidad del tratamiento y cambian su morfología.

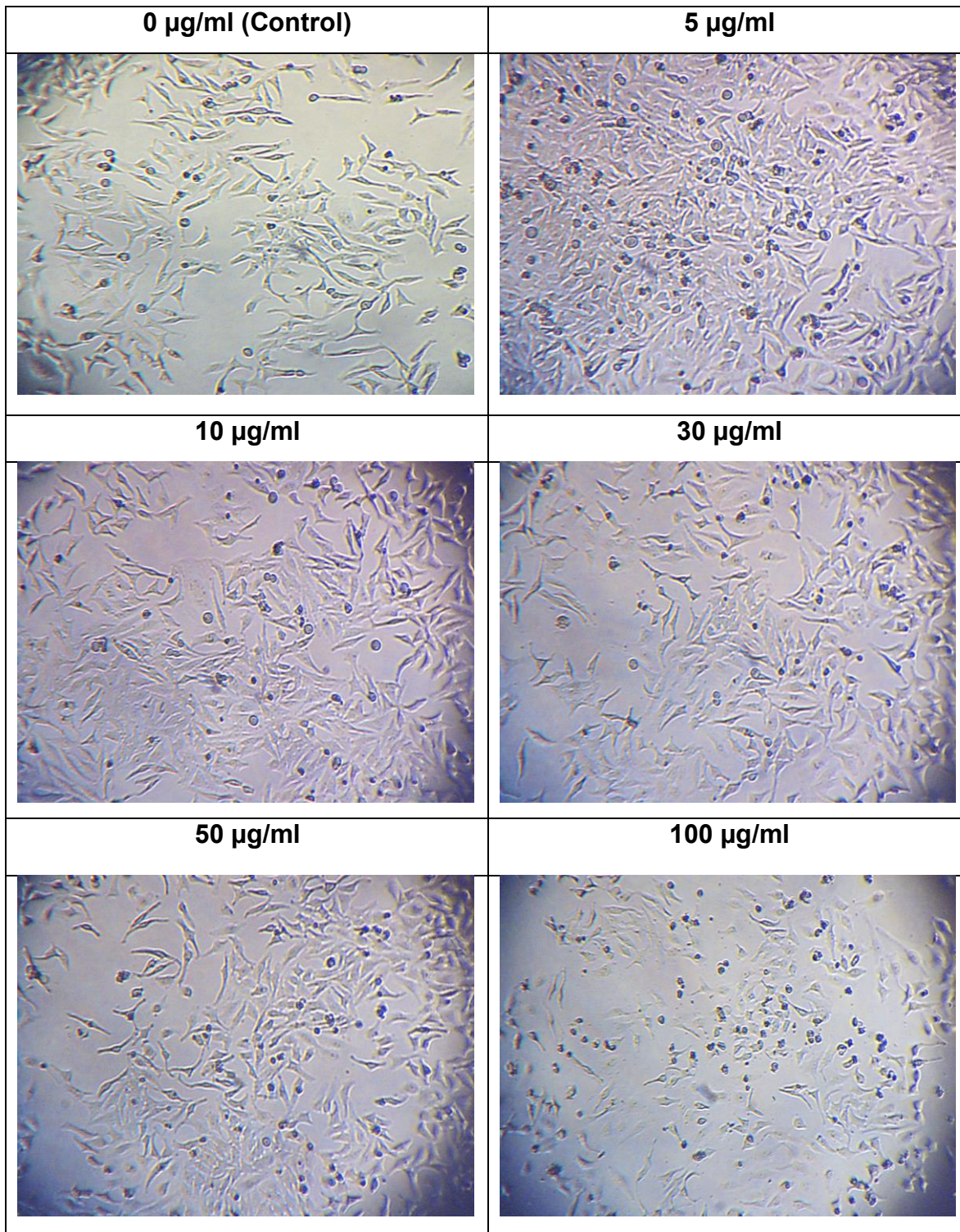


Figura 17. Células HeLa tratadas por 24 h con CPT. El tratamiento se administró en concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Nótese que a mayor concentración del tratamiento, menor confluencia celular. Las células se desprenden del pozo debido a la citotoxicidad del tratamiento y cambian su morfología. Sin embargo la toxicidad es menor si se compara con el tratamiento con oxCNTHACPT.

La oxidación y la funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad.

La citotoxicidad observada en los cultivos celulares, expuestos a los tratamientos, se determinó mediante los ensayos de viabilidad con MTT, ya que la cantidad de sales de formazán producida por las enzimas mitocondriales es proporcional a la cantidad de células vivas (Bahuguna, et al., 2017).

A continuación, se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad con MTT de las líneas celulares empleadas y expuestas a los diferentes tratamientos y dosis.

En las figuras 18 a 20, se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad con MTT tanto en las células no tumorales NIH-3T3 como en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 expuestas a los diferentes tratamientos y concentraciones. Se observó que la oxidación y la funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad

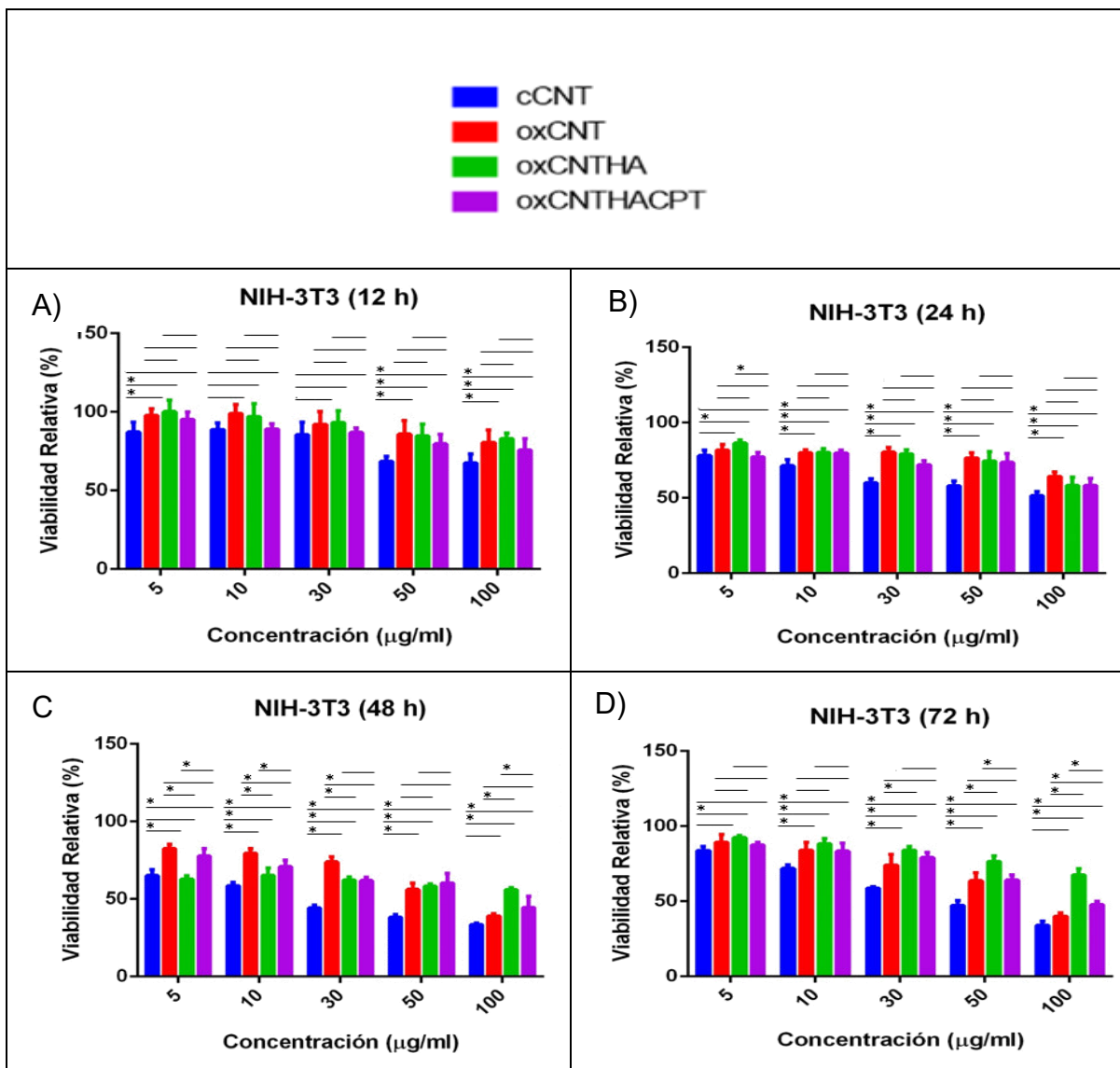


Figura 18. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular NIH-3T3. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular no tumoral NIH-3T3 tras la administración de cCNT (barra azul), oxCNT (barra roja), oxCNTHA (barra verde) y oxCNTHACPT (barra morada) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que la oxidación y funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad. N= 5. Test estadístico de Tukey. P < 0.05. El asterisco (*) indica significancia estadística.

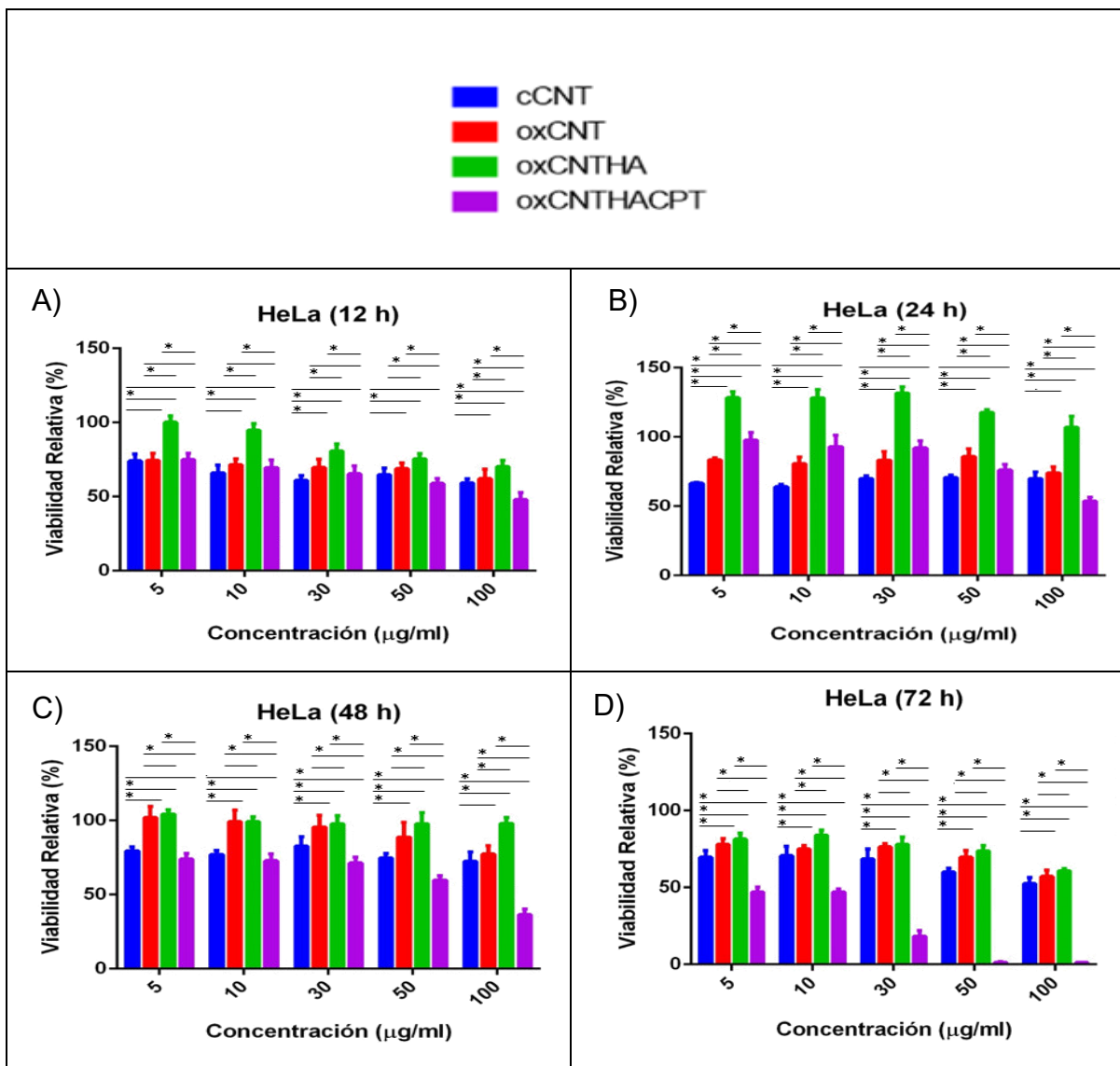


Figura 19. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular HeLa. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular tumoral HeLa tras la administración de cCNT (barra azul), oxCNT (barra roja), oxCNTHA (barra verde) y oxCNTHACPT (barra morada) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h. C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que la oxidación y funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad. N= 5. Test estadístico de Tukey. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

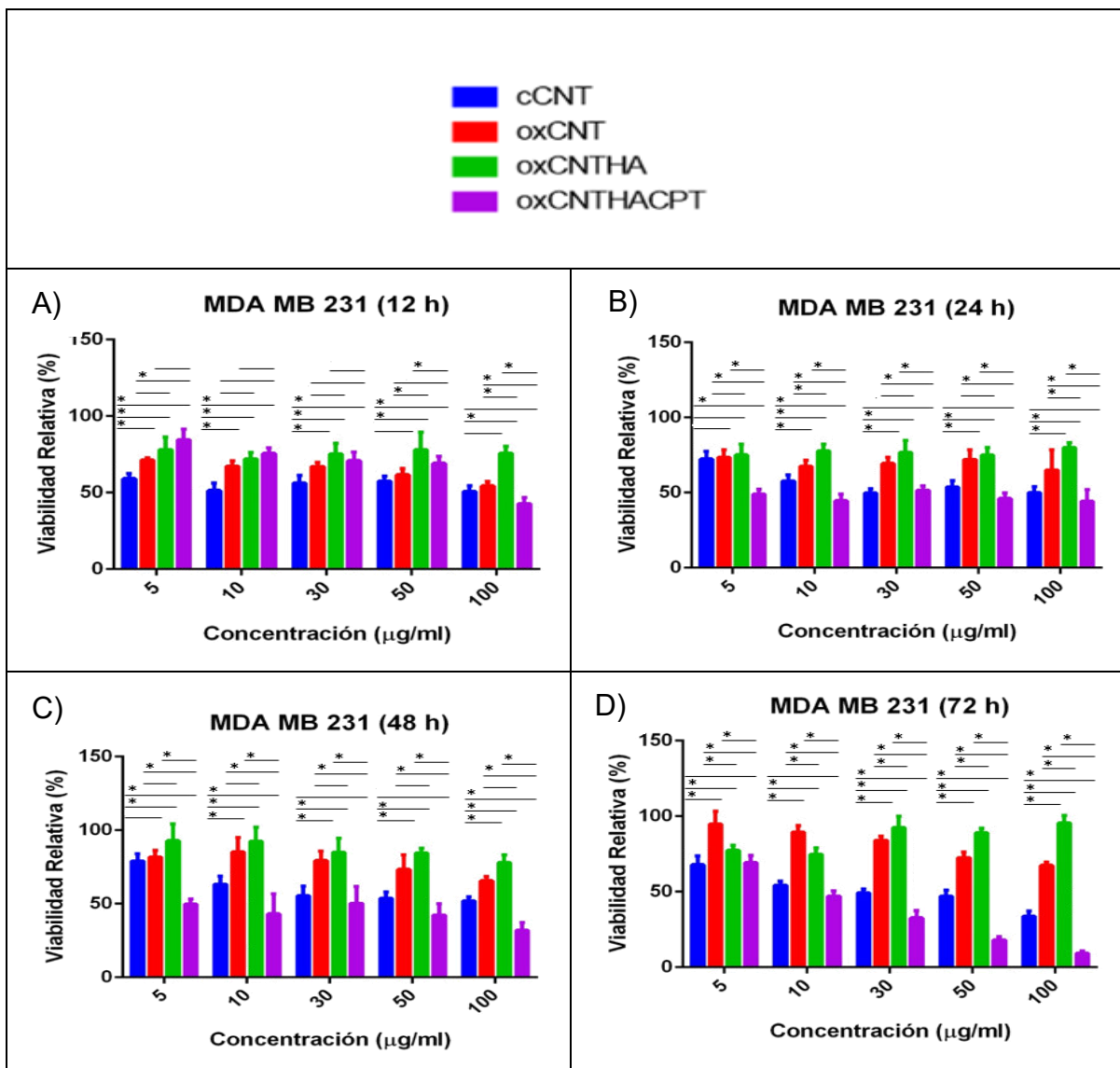


Figura 20. Citotoxicidad de los nanotubos en la línea celular MDA-MB-231. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular tumoral MDA-MB-231 tras la administración de cCNT (barra azul), oxCNT (barra roja), oxCNTHA (barra verde) y oxCNTHACPT (barra morada) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h. C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que la oxidación y funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad. N= 5. Test estadístico de Tukey. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos con los ensayos con MTT, se procedió a realizar ensayos de contraste de núcleos con DAPI, el cual es un colorante fluorescente en azul y que tiene afinidad por las bases nitrogenadas del ADN.

Para ello se administraron los diferentes tratamientos de nanotubos a las tres líneas celulares empleadas, a dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 ug/ml por 24 h.

En estos ensayos de contraste de núcleos con DAPI se obtuvieron resultados similares a los de MTT, demostrando que la oxidación y la funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad tanto en células no tumorales como en células tumorales.

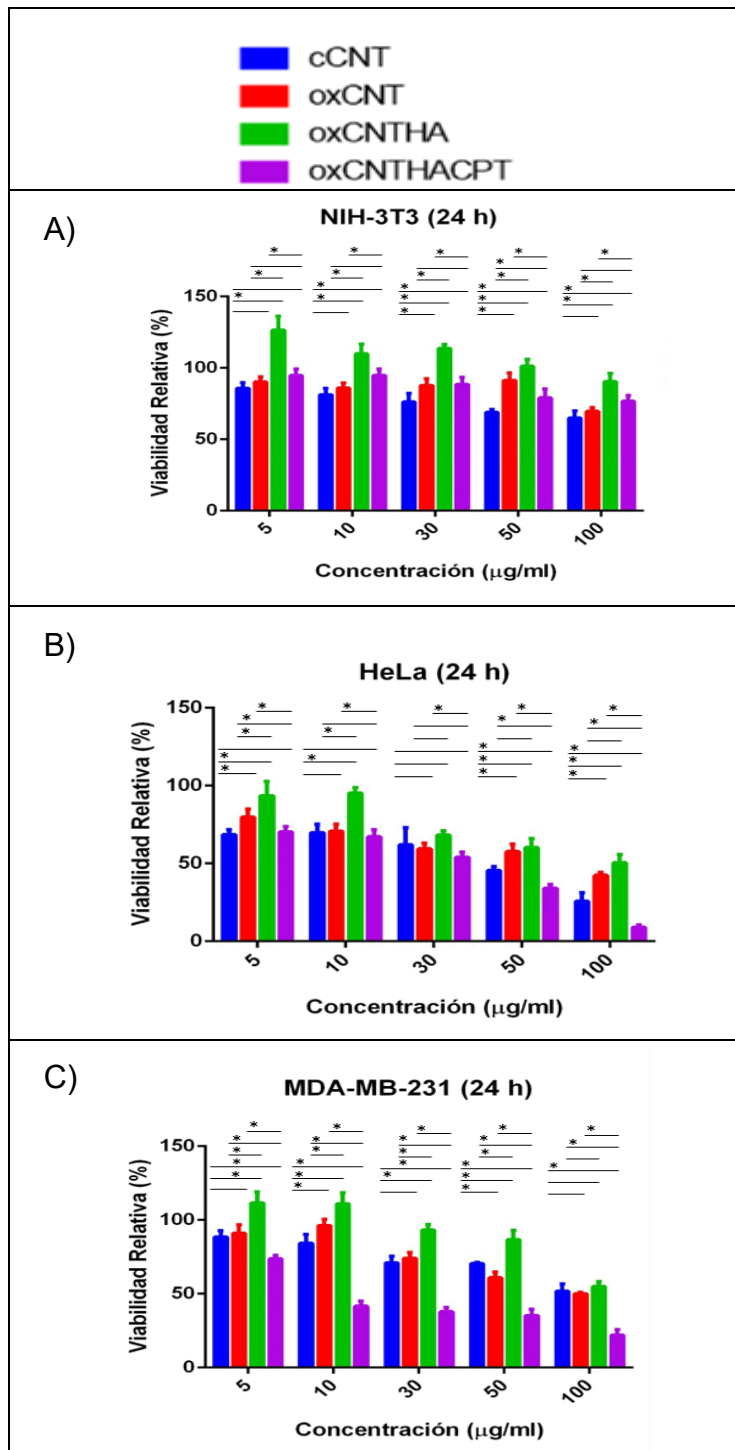


Figura 21. Citotoxicidad de los nanotubos en las líneas celulares NIH-3T3, HeLa y MDA-MB-231. Ensayos graficados de contrastes de núcleos con DAPI que representan la viabilidad de las líneas celulares A) no tumoral (NIH-3T3), B) tumoral (HeLa) y C) tumoral (MDA-MB-231) tras la administración de cCNT (barra azul), oxCNT (barra roja), oxCNTHA (barra verde) y oxCNTHACPT (barra morada) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante 24 h. Obsérvese que la oxidación y funcionalización de los cCNT disminuyen su citotoxicidad. N= 4. Test estadístico de Tukey. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

El tratamiento con el nanodispositivo oxCNTHACPT presentó mayor actividad citotóxica contra células tumorales en comparación con la administración de CPT.

A continuación, se evaluó la eficacia del nanovector (oxCNTHACPT) comparada con la del CPT en las tres líneas celulares empleadas a concentraciones de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml en tiempos de 12, 34, 48 y 72 h de CPT. Estos ensayos de viabilidad se analizaron con el método de MTT.

En los ensayos de viabilidad de las células NIH-3T3 se observó que a las 12 h ambos tratamientos causaron una citotoxicidad similar, sin embargo, a partir de las 24 h, el CPT mostró poseer mayor actividad citotóxica contra las células no tumorales en comparación con el oxCNTHACPT. Disminuyendo drásticamente la viabilidad celular a partir de las 48 h y desde bajas dosis. El oxCNTHACPT no presentó un efecto citotóxico drástico en la línea celular no tumoral (Figura 22).

En contraste, en las células tumorales HeLa expuestas a CPT y oxCNTHACPT en las diferentes dosis y concentraciones, se observó que a las 12 y 24 h, a bajas concentraciones, ambos tratamientos tienen una citotoxicidad similar, sin embargo, a partir de las 48 h el oxCNTHACPT mostró poseer mayor actividad citotóxica contra las células tumorales comparado con el CPT, requiriéndose mayores dosis de CPT para lograr un efecto citotóxico similar al del oxCNTHACPT (Figura 23).

De la misma manera, en los ensayos de viabilidad con MTT en las células tumorales MDA-MB-231 expuestas a CPT y oxCNTHACPT en las diferentes dosis y concentraciones, los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, es decir que el oxCNTHACPT mostró mayor actividad citotóxica que el CPT desde las 12 h de exposición, necesitando de dosis mayores de CPT para lograr un efecto citotóxico similar al del oxCNTHACPT (Figura 24).

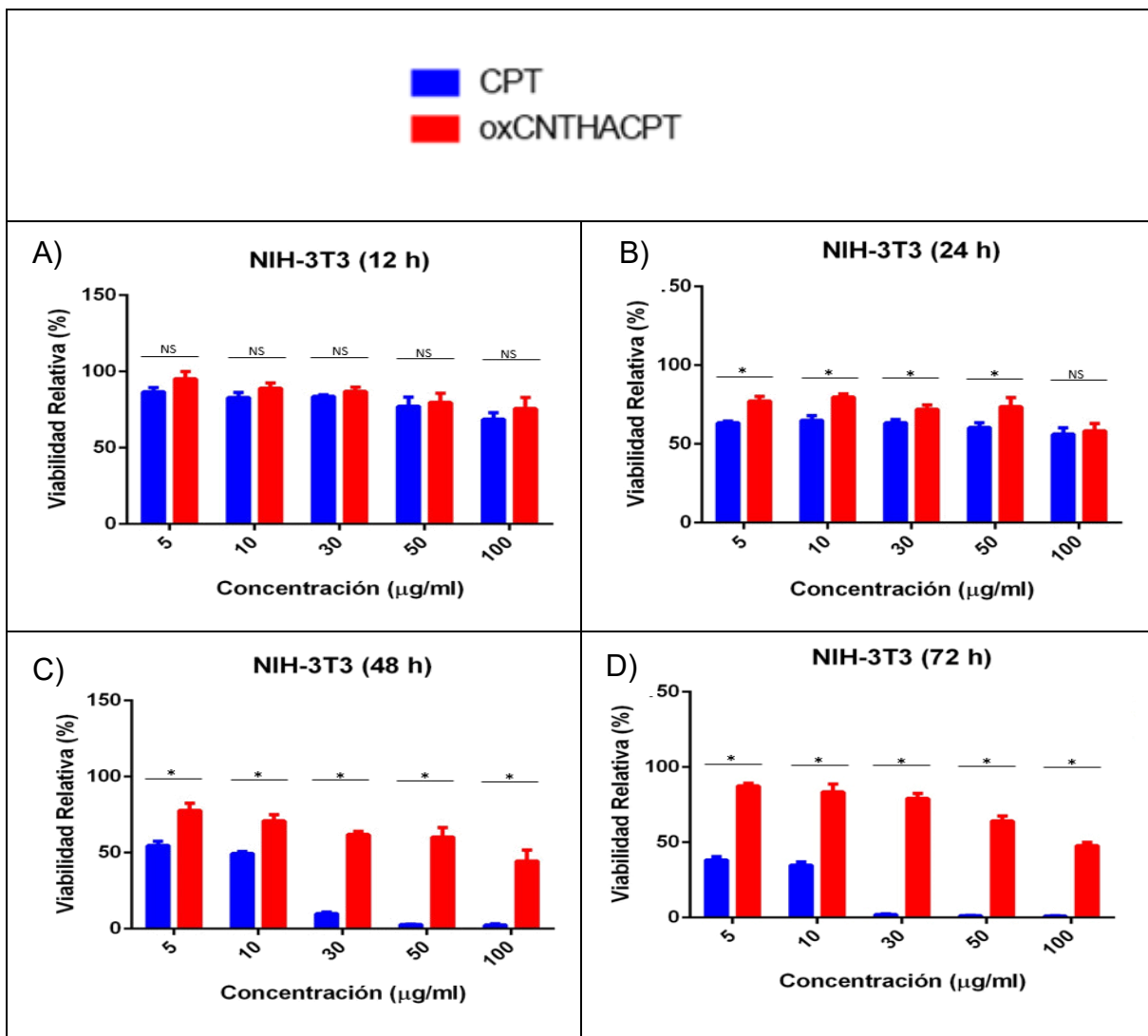


Figura 22. Selectividad del nanovector en la línea celular NIH-3T3. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular no tumoral NIH-3T3 tras la administración de CPT (barra azul) y oxCNTHACPT (barra roja) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h. C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que a partir de las 24 h de exposición, el CPT tiene mayor efecto citotóxico comparado con el oxCNTHACPT. N= 5. Test estadístico de T de Student. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

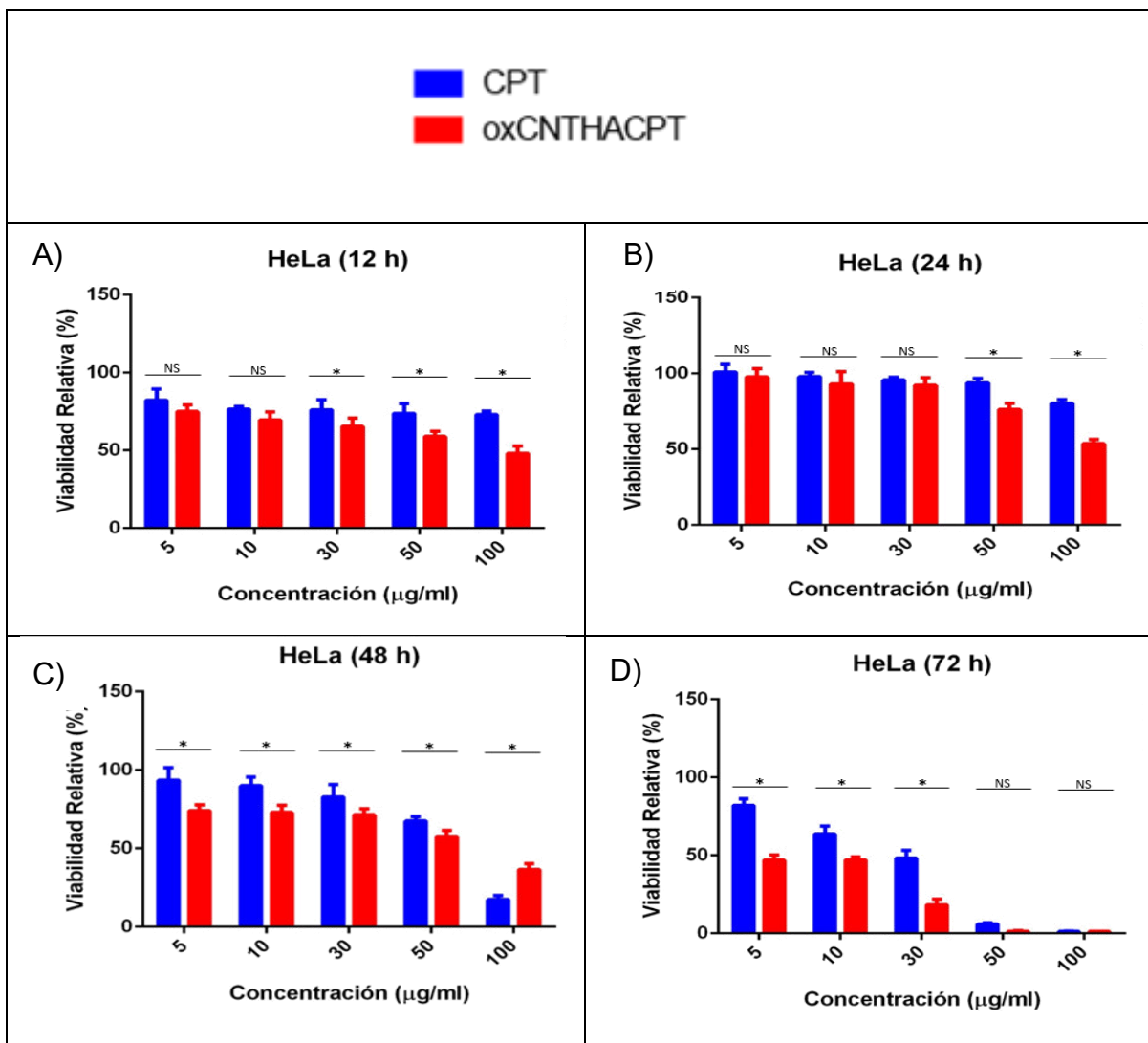


Figura 23. Selectividad del nanovector en la línea celular HeLa. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular tumoral HeLa tras la administración de CPT (barra azul) y oxCNTHACPT (barra roja) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h. C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que el tratamiento con oxCNTHACPT presenta mayor efecto citotóxico en comparación con el CPT contra esta línea celular tumoral. N= 5. Test estadístico de T de student. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

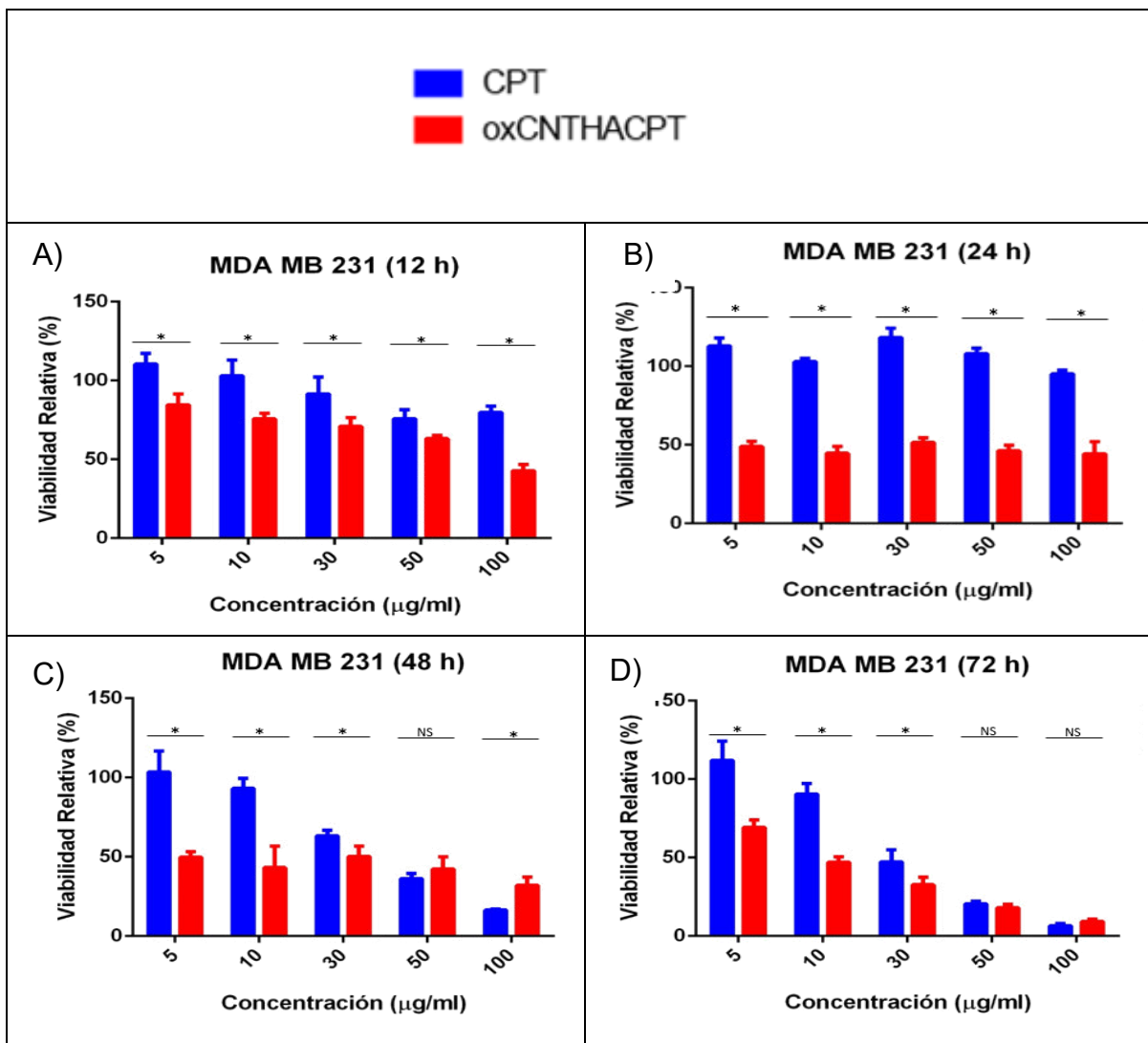


Figura 24. Selectividad del nanovector en la línea celular MDA-MB-231. Ensayos de MTT graficados que representan la viabilidad de la línea celular tumoral MDA-MB-231 tras la administración de CPT (barra azul) y oxCNTHACPT (barra roja) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante A) 12 h. B) 24 h. C) 48 h. D) 72 h. Obsérvese que el tratamiento con oxCNTHACPT presenta mayor efecto citotóxico en comparación con el CPT contra esta línea celular tumoral. N= 5. Test estadístico de T de Student. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

Con el propósito de confirmar los resultados de viabilidad celular obtenidos en los ensayos con MTT, se procedió a realizar ensayos de contraste de núcleos con DAPI. Para ello se administraron los diferentes tratamientos de nanotubos a las tres líneas celulares empleadas, a dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 ug/ml y se expusieron a los tratamientos por 24 h.

Se obtuvieron resultados similares a los de MTT, demostrando que el tratamiento con oxCNTHACPT tiene poca toxicidad contra células no tumorales, mientras que el CPT tiene citotoxicidad significativa contra las células no tumorales. Por el contrario, el tratamiento con oxCNTHACPT a las células tumorales mostró mayor efecto citotóxico en comparación con el CPT, requiriéndose de mayores dosis de CPT para alcanzar un efecto similar al del oxCNTHACPT. Estos resultados se atribuyen a la funcionalización con HA que permite biodirigir el nanovector hacia las células tumorales (Figura 25).

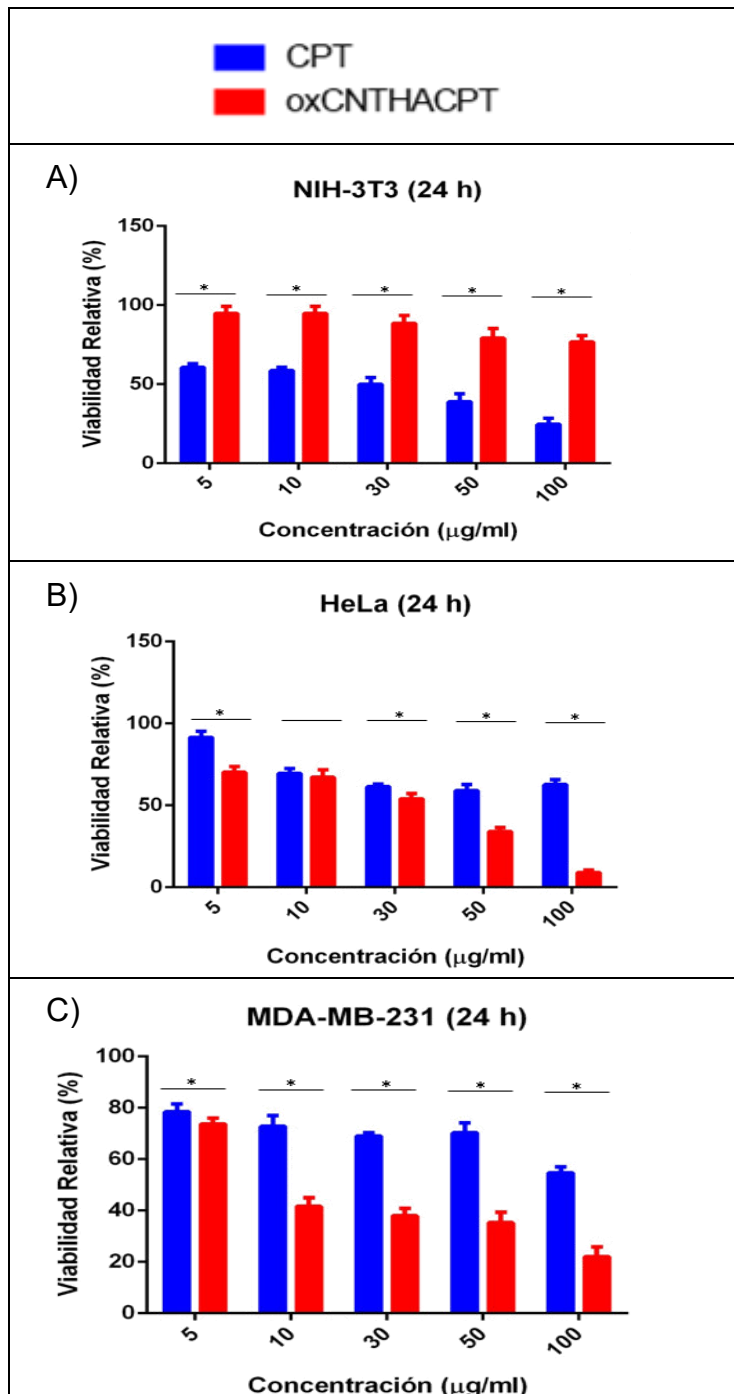


Figura 25. Selectividad del nanovector en las líneas celulares NIH-3T3, HeLa y MDA-MB-231. Ensayos graficados de contrastes de núcleos con DAPI que representan la viabilidad de las líneas celulares A) no tumoral (NIH-3T3), B) tumoral (HeLa) y C) tumoral (MDA-MB-231) tras la administración de CPT (barra azul) y oxCNTHACPT (barra roja) en dosis de 0, 5, 10, 30, 50 y 100 µg/ml. Las células fueron expuestas a los tratamientos durante 24 h. N= 4. Nótese que en la línea celular no tumoral, el tratamiento con CPT fue más citotóxico en comparación con oxCNTHACPT. El efecto se invierte en las líneas celulares tumorales, es decir el oxCNTHACPT fue más citotóxico en comparación con el CPT. Test estadístico T de student. P < 0.05. El * indica significancia estadística.

5. DISCUSIÓN

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para fines médicos, se encarga de emplear nanomateriales para el diagnóstico, monitoreo, prevención y tratamiento de enfermedades (Tinkle, et al., 2014). Los CNT son alótropos del carbono y se han aplicado con éxito en el campo de la medicina, y debido a que poseen una gran área de superficie y por su estabilidad química se pueden conjugar con una variedad de agentes terapéuticos (He et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que los CNT son un excelente vehículo para la entrega de fármacos debido a que penetran de manera directa en las células y mantienen el fármaco intacto y sin metabolizar durante su transporte (Usui, et al., 2012), además la entrega del fármaco a las células es más segura y efectiva, comparado con las terapias convencionales (Singh, et al., 2012). El presente trabajo parte del antecedente directo reportado por nuestro departamento, en el 2019 en el que Salas y cols. lograron desarrollar un nanovector funcionalizado con HA y cargado con CPT que demostró presentar actividad citotóxica contra células tumorales murinas TC-1. Dicho efecto resultó ser selectivo contra las células tumorales murinas, por el contrario, en células no tumorales el efecto citotóxico del nanovector no resultó ser significativo. En este trabajo se buscó ampliar la aplicación y evaluación del efecto del nanovector funcionalizado con HA y cargado con CPT en dos nuevas líneas celulares tumorales, pero en este caso, humanas, de adenocarcinoma cervical (HeLa) y de adenocarcinoma mamario (MDA-MB-231). Se conoce que actualmente la terapia convencional para dichos tipos de cáncer en humanos depende el estadio en el que se encuentren, requiriendo de quimioterapia cuando el estadio es avanzado, siendo los compuestos platinados los fármacos de elección para combatir ambos tipos de cáncer. Sin embargo, la respuesta es muy variable, y no siempre es favorable y no está exenta de efectos adversos severos (Cohen, 2019 & Waks, 2019). De aquí surge la necesidad de explorar alternativas para abordajes terapéuticos. Debido a que el empleo del nanovector demostró su potencial como anti-cancerígeno en modelo celular murino, en este trabajo se exploró su potencial en modelos celulares humanos.

Posterior a reproducir la metodología empleada por Salas et al., en 2019 para la síntesis del nanovector funcionalizado con HA y cargado con CPT se obtuvo dicho nanovector y se caracterizó su morfología mediante MET. La pared de los cCNT se observó electrodensa y delgada, mientras que en el nanovector sus paredes se visualizaron electrodensas de mayor grosor, esto debido a la oxidación y funcionalización de sus paredes. Mientras que el interior de los cCNT lucía vacío, el interior del nanovector lucía ocupado por partículas de CPT. Se ha descrito a la MET como un método adecuado de caracterización morfológica para los nanotubos debido a que nos permite visualizar cambios en la electrodensidad de sus paredes, así como su interior, sin dañar o modificar su estructura (Luo, et al., 2011).

Antes de administrar el nanovector a las líneas celulares, fue necesario demostrar si estas sobre-expresan el receptor del HA (CD44), ya que la funcionalización con HA del nanovector le otorga biodireccinamiento por las moléculas de HA en la superficie, lo que permite que el nanovector sea endocitado en su mayoría por las células tumorales que sobre-expresan este receptor CD44; además, al estar cargado con CPT funciona como un nanosistema liberador de fármaco bioridigido. Efectivamente, las líneas celulares tumorales empleadas en este proyecto sobre-expresan el receptor CD44, esto lo demostramos mediante el método de inmunofluorescencia indirecta, en donde se visualizó positividad citoplasmática en ambos tipos de líneas celulares tumorales humanas, mientras que en los fibroblastos (células no tumorales) esta señal fue negativa. Previamente se ha descrito que las células HeLa y MDA-MB-231 sobre-expresan el CD44 (Wang et al., 2013; Ghanmbari et al., 2016). Es importante demostrar que las células blanco sobre-expresen el receptor debido a que es un punto clave para el biodireccinamiento del nanovector.

Una vez listo el nanovector y demostrado que las células tumorales humanas sobre-expresan el receptor CD44, se continuó con la administración de los tratamientos a distintas concentraciones y tiempos de exposición. Se observó que la oxidación y la funcionalización de los cCNT disminuyeron su citotoxicidad, una característica muy importante que debe tener un nanovector para la entrega del fármaco en forma

segura. Se ha descrito que la citotoxicidad de los cCNT es debida a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), una producción excesiva de ROS induce la liberación de mediadores inflamatorios y finalmente se produce apoptosis. Al realizar la oxidación y funcionalización de los cCNT, se eliminan impurezas en su superficie, se reduce su dimensión y además se mejora su solubilidad, diversos estudios han demostrado que estas modificaciones disminuyen su citotoxicidad (Costa, P., et al., 2016). Además la mayor parte de la toxicidad debe atribuirse al fármaco, como lo pudimos demostrar con nuestro nanovector cargado con CTP, y esto ocurrió en todas las concentraciones y tiempos.

La citotoxicidad fue evaluada mediante ensayos de viabilidad con MTT, el cual es un ensayo muy versátil y se emplea para evaluar indirectamente la viabilidad celular, demostrando con ello la toxicidad de las diferentes modificaciones de los cCNT. Se recomienda que los resultados sean confirmados con otro método que demuestre la viabilidad celular, nosotros elegimos el contraste de núcleos con DAPI, como se ha descrito en otros estudios (Belyanskaya, 2007). Con ambos ensayos obtuvimos resultados similares, con esto podemos asegurar que nuestros resultados son congruentes.

Posteriormente se evaluó la eficacia del nanovector (terapia novedosa) frente al CPT (terapia convencional) y se encontró que el nanovector fue citotóxico para las células tumorales humanas de manera significativa, efecto observable desde las 12 H de exposición de las células tumorales a los tratamientos, mientras que el CPT también tuvo efecto citotóxico pero menor en comparación con el nanovector; se requirieron mayores dosis de CPT para lograr un efecto citotóxico similar al del nanovector en las células tumorales humanas. Por otra parte, en las células no tumorales, el nanovector no presentó un efecto citotóxico significativo, mientras que el CPT si presentó efecto citotóxico evidente.

Con estos resultados se demostró que el nanovector se biodirige hacia las células tumorales, produciendo un efecto citotóxico selectivo en las mismas. Como perspectiva queda a investigar si estos efectos se mantienen con otras líneas celulares humanas y realizar ensayos *in vivo*, en los cuales se esperarían encontrar

una disminución importante de los efectos adversos provocados usualmente por el empleo de la quimioterapia convencional.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones:

- Se obtuvo un nanovector basado en cCNT, funcionalizado y cargado con CPT.
- La sobre-expresión del receptor CD44 en las líneas celulares tumorales permitió una mayor internalización del nanovector cargado con CPT.
- La funcionalización con HA de los nanotubos disminuye su citotoxicidad tanto en células tumorales humanas como en células no tumorales, produciendo un vector seguro para la entrega de CPT.
- El nanovector posee menor efecto citotóxico que el CPT en células no tumorales, por otra parte, en las células tumorales humanas, mostró mayor efecto citotóxico que el CPT, esto se atribuye al biodireccionamiento del nanovector.
- Por lo tanto, nuestra hipótesis se acepta ya que el nanovector cargado con CPT tiene actividad citotóxica contra células tumorales humanas *in vitro*.

Perspectivas:

- Extender la aplicación de los tratamientos con cCNT, oxCNT, oxCNTHA y oxCNTHACPT a otras líneas celulares tumorales humanas que sobre-expresen el receptor CD44.
- Realizar bloqueo de los receptores CD44 en las líneas celulares tumorales *in vitro* para determinar un posible mecanismo de inactivación de la terapéutica con nanotubos funcionalizados con HA.
- Realizar ensayos *in vivo* en modelos murinos para evaluar la respuesta anti-neoplásica de los nanotubos y evaluar los efectos adversos producidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abcam (2020). MTT Assay Kit (Cell Proliferation) ab211091. Recuperado de: <https://www.abcam.com/mtt-assay-kit-cell-proliferation-ab211091.html>.

Aguirre, Y., Castrejón, K., & Méndez, I. (2016). La Nanomedicina y los Sistemas de Liberación de Fármacos: ¿la (R)evolución de la Terapia Contra el Cáncer? *Educación Química*; 27(4): 286. DOI: 10.1016/j.eq.2016.07.002.

Alam, A., Farooq, U., Singh, R., Dubey, V., Kumar, S., Kumari, R., Naik, K. K., Tripathi, B., & Dhar, K. (2018). Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. *Open Acc J of Toxicol* ;2(5): 555600. DOI: 10.19080/OAJT.2018.02.555600.

Allen, B., Kichambare, P., Gou, P. et al. (2008). Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes Through Enzymatic Catalysis. *Nano Letters*. 8(11): 3899-3903.

American Type Culture Collection. (2020). HeLa (ATCC ® CCL-2™). Recuperado de: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#characteristics>.

American Type Culture Collection. (2020). MDA-MB-231 (ATCC ® HTB-26™). Recuperado de: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation>.

American Type Culture Collection. (2020). NIH/3T3 (ATCC ® CRL-1658™). Recuperado de: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx>.

Astruc, D. (2015). Introduction to Nanomedicine. *Molecules*. (21): 4. DOI:10.3390/molecules21010004.

Baskaran, D., Mays, J. & Bratcher, M. (2005). Noncovalent and Nonspecific Molecular Interactions of Polymers with Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chemistry of Materials*. (17): 3389-3397.

Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P, et al. (2007). The Reliability and Limits of the MTT Reduction Assay for Carbon Nanotubes-Cell Interaction. *Carbon*. (45): 2643-2648. DOI: 10.1016/j.carbon.2007.08.010.

Chen, C., Zhao, S., Karnad, A & Freeman, J. (2018). The Biology and Role of CD44 in Cancer Progression: Therapeutic Implications. *Journal of Hematology & Oncology*. 11(64). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>.

Cohen, P., Jhingran, A, Oaknin, A., et al. (2019). Cervical Cancer. *The Lancet*. 393: 169-182.

Costa, P., Bourgoignon, M, Wang, J., et al. (2016). Functionalised Carbon Nanotubes: From Intracellular Uptake and Cell-Related Toxicity to Systemic Brain Delivery. *Journal of Controlled Release*. 241(10):200-219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.033>.

Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, I. & Galiotis, C. (2008). Chemical Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Carbon*. (46): 833-840. DOI:10.1016/j.carbon.2008.02.012.

Enyashin, A. & Ivanovskii, A. (2007). Functionalization of Carbon Nanotubes by Covalently Bonded Graphite Nanoplatelets: A Theoretical Study. *Mendeleev Communications*. (17): 199-201. DOI: 10.1016/j.mencom.2007.06.003.

Ghanbari, T., Azadbakht, M., Vesi, A., et al. (2016). Isolation of Breast Cancer Stem Cell from MDA-MB231 Cell Line Using Vincristine. *International Journal of Morphology*. 34 (4): 1197-1202. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000400003>.

Hahm M., Hashim, D., Vajtai, R. & Ajayan, P. (2011). A review: controlled synthesis of vertically aligned carbon nanotubes. *Carbon letters*. (12): 185-193. DOI: <http://carbonlett.org/10.5714/CL.2011.12.4.185>.

Holzinger, M., Vostrowsky, O., Hirsch, A., Hennrich, F., Kappes, M., Weiss, R. & Jellen, F. (2001). Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes. *Angewandte*

Chemie International Edition. (40): 4002-4005. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20011105\)40:21<4002::AID-ANIE4002>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20011105)40:21<4002::AID-ANIE4002>3.0.CO;2-8).

Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. (354): 56-58. DOI: 10.1038/354056a0.

Jia, G, Wang, H., Yan, L. et al. (2005). Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Walled Nanotube, Multi-Wall Nanotube and Fullerene. *Environmental Science and Technology*. (39): 1378-1383. DOI: <https://doi.org/10.1021/es048729l>.

Kagan, V., Konduro, N., Feng, W. et al. (2010). Carbon Nanotubes Degraded by Neutrophil Myeloperoxidase Induce Less Pulmonary Inflammation. *Nature Nanotech*. (5): 354-359. DOI: <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.44>.

Karthikeyan, S., Mahalingam, P. & Karthik, M. (2009). Large Scale Synthesis of Carbon Nanotubes. *E-Journal of Chemistry*.(6):1-12. ISSN: 0973-4945.

Kergozar, S., & Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings* (5): 15492–15500.

Lee, C. J., Lyu, S. C., Kim, H. W., Park, C. Y., & Yang, C. W. (2002). Large-scale production of aligned carbon nanotubes by the vapor phase growth method. *Chemical Physics Letters*. (359):109-114. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00648-6).

Luo, Z., Oki, A., Carson, L., et al. (2011). Thermal Stability of Functionalized Carbon Nanotubes Studied by *In-Situ* Transmission Electron Microscopy. *Chemical Physics Letters*. 513 (1-3): 88-93. DOI: 10.1016/j.cplett.2011.07.072.

McDevitt, M., Chattopadhyay, D., Jaggi, J., Finn, R., Zanzonico, P., Villa, C., Rey, D., Mendenhall, J., Batt, C., Njardarson, J. & Scheinberg, D. (2007). PET Imaging of Soluble Yttrium-86-Labeled Carbon Nanotubes in Mice. *PLoS ONE* (9): e907. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000907>.

Bahuguna, A., et al. (2017). MTT Assay to Evaluate the Cytotoxic Potential of a Drug. *Bangladesh J. Pharmacol.* (12): 115-118.

Muller, J., Delos, M., Panin, N. et al. (2009). Absence of carcinogenic Response to Multiwall Carbon Nanotubes in a 2-Year Bioassay in the Peritoneal Cavity of the Rat. *Toxicological Sciences.* 110(2): 442-448. DOI:10.1093/toxsci/kfp100.

Murray, A., Kisin, E., Tkach, A. et al. (2012). Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Particle and Fibre Toxicology.* (9): 10. DOI: 10.1186/1743-8977-9-10.

Nation Cancer Institute. (2015). Types of Cancer Treatment. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.

National Cancer Institute. (2015). Understanding Cancer. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

Nowack, B., & Bucheli, T. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* (150): 5-22. DOI:10.1016/j.envpol.2007.06.006.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives.* (113): 823-839. DOI:10.1289/ehp.7339.

Orian, V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasing tumors. *European Journal of Cancer.* (46): 1271-1277. DOI:10.1016/j.ejca.2010.02.024.

Oun, R., Moussa, Y., & Wheate, N. (2018). The Side Effects of Platinum-based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Royal Society of Chemistry;* 47: 6645. DOI: 10.1039/c8dt00838h.

Pastorin, G. (2009). Crucial Functionalizations of Carbon Nanotubes for Improved Drug Delivery: A Valuable Option? *Pharmaceutical Research.* (26): 746-769.

Banerjee, S., Benny, T. & Wong, S. (2005). Covalent Surface Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*. (17): 17-29. DOI: 10.1002/adma.200401340.

Poland, C., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W. & Donaldson, K. (2008). Carbon Nanotubes Introduced Into the Abdominal Cavity of Mice Show Asbestos-Like Pathogenicity in a Pilot Study. *Nature Nanotechnology*. (3):423-428. DOI:10.1038/nnano.2008.111.

Rosario, B., Contés, E., Pérez, M. & Cabrera, C. (2005). Attachment of Single-Wall Carbon Nanotubes on Platinum Surfaces by Self-Assembling Techniques. *Reviews on Advanced Materials Science*. (10): 381-386.

Russier, J., Méndar, C., Venturelli, E. et al. (2010). Oxidative Biodegradation of Single- and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanoscale*. (3): 893-896. DOI: 10.1039/c0nr00779j.

Saeed, K. & Ibrahim. (2013). Carbon nanotubes-properties an applications: a review. *Carbon Letters*. (14): 131-144. DOI:10.5714/CL.2013.14.3.131.

Salas, D., Saucedo, O., Loera, M. et al. (2017). Carbon Nanotubes: An Alternative for Platinum-Based Drugs Delivery Systems. *JBOUN*. 23(3): 541-549.

Salas, D., Saucedo, O., Loera, M. et al. (2019). Hyaluronate Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes Filled with Carboplatin as a Novel Drug Nanocarrier Against Murine Lung Cancer Cells. *Nanomaterials*. (9): 1572. DOI:10.3390/nano9111572.

Secretaría de Salud. (2017). Cáncer, tercera causa de muerte en México. México. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>.

Shvedova, A., Kapralov, A., Feng, W. et al. (2012). Impaired Clearance and Enhanced Pulmonary Inflammatory/Fibrotic Response to Carbon Nanotubes in Myeloperoxidase-Deficient Mice. *PLoS ONE*. 7(3): e30923. DOI:10.1371/journal.pone.0030923.

Singh, B., Baburao, C., Pispati, V, et al. (2012). Carbon Nanotubes – A Novel Drug Delivery System. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. 2 (2): 523-532.

Thess, A., et al. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. (1996). *Science*. (273): 483-487. DOI: 10.1126/science.273.5274.483.

Tinkle, S., McNeil, S., Mühlebach, S., et al. (2014). Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1313 (1): 35-56. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12403>.

Usui, Y., Haniu, H., Tsuruoka, S., et al. (2012). Carbon Nanotubes Innovate on Medical Technology. *Medicinal Chemistry*. 2 (1): 001-006. DOI: 10.4172/2161-0444.1000105.

Waks, A & Winer, E. (2019). Breast Cancer Treatment A Review. *JAMA*. 321 (3): 288-300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.

Wang, K., Zeng, J., Luo, L., et al. (2013). Identification of a Cancer Stem Cell-Like Side Population in the HeLa Human Cervical Cell Line. *Oncology Letters*. (6): 1673-1680. DOI: 10.3892/ol.2013.1607.

World Health Organization. (2018). Cancer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Xie, S., Li, W., Pan, Z., Chang, B. & Sun, L. (2000). Carbon nanotubes arrays. *Material Science and Engineering*. (30): 11-15. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(00\)00657-2](https://doi.org/10.1016/S0921-5093(00)00657-2).

Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K. et al. (2010). Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape. *Inflammation*. (33) 276–280. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9182-7>.