

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL TIPO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR UN
NANOVECTOR GRAFÉNICO CARGADO CON CARBOPLATINO
SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS**

POR

M.C.P. CHRISTIAN ALEXIS GÓMEZ TRISTAN

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2022

**“ANÁLISIS DEL TIPO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR UN
NANOVECTOR GRAFÉNICO CARGADO CON CARBOPLATINO
SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”**

Aprobación de tesis:



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Co-Directora



Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C.P. Christian Alexis Gómez Tristan

Fecha de disertación: Agosto 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título: Análisis del tipo de muerte celular inducida por un nanovector grafénico cargado con carboplatino sobre células tumorales humanas.

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

Número de páginas: 82

Área de estudio: Nanomedicina

Propósito y Método de Estudio: El cáncer es un problema de Salud Pública que encabeza las listas de morbilidad y mortalidad a nivel global y en nuestro país. Dentro de los tratamientos más utilizados para el cáncer se encuentra la quimioterapia, en la que se emplean fármacos como los compuestos platinados. Sin embargo, estos compuestos presentan una alta toxicidad y una baja especificidad contra las células tumorales, provocando una gran variedad de efectos secundarios. En la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la lucha contra el cáncer, se ha evaluado el uso de los nanotubos de carbono (CNTs) como sistema de entrega de fármacos, los cuales han demostrado resultados prometedores en los últimos años. En nuestro equipo de trabajo estamos desarrollando un nanovector para la entrega de Carboplatino (CPT) de manera segura y eficaz. Por lo que, consideramos importante determinar si el nanovector biodirigido cargado con CPT presenta citotoxicidad específica contra células tumorales humanas y si este efecto es mediado por apoptosis.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvo una amplia caracterización mediante métodos de microscopía, espectroscópicos y fisicoquímicos de las diferentes construcciones de CNTs, demostrando la presencia del ácido hialurónico (HA) y el CPT. También se demostró la especificidad citotóxica y la seguridad de los CNTs oxidados funcionalizados con HA y cargados con CPT (OxCNTs-HA-CPT) hacia células tumorales y no tumorales humanas, respectivamente mediante ensayos de viabilidad celular. Finalmente se demostró mediante ensayos de inmunofluorescencia que los OxCNTs-HA-CPT inducen un efecto citotóxico mediado por apoptosis dependiente de Caspasa 3-activa.



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director

AGRADECIMIENTOS

Cuando entré a la Facultad de Medicina no tenía idea lo que me esperaba, como cualquier estudiante con miedos e ilusiones sabía que habría cambios importantes en mi vida, pero jamás pensé que en el primer semestre encontraría algo que me gustara tanto para dedicarle toda la licenciatura, el servicio social e incluso una maestría. Estoy seguro de que esto fue por la gran fortuna que tuve al conocer a las personas increíbles que agradeceré a continuación. Antes de comenzar me gustaría citar palabras escritas en un ensayo del 2008 por Martin A. Schwartz relacionado con la ciencia: “Una de las cosas hermosas de la ciencia es que nos permite ir dando tumbos, equivocándonos una y otra vez, y sentirnos perfectamente bien siempre que aprendamos algo cada vez” palabras que describen a la perfección lo vivido durante estos dos años al realizar este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a la persona que despertó mi interés por la investigación, mi tutor el Dr. C. Adolfo Soto Domínguez quien fue el responsable de guiarme a lo largo de la realización de esta tesis, desde hace más de siete años que lo conozco siempre ha sido un excelente maestro que me ha ayudado con su conocimiento, su paciencia y además de ser una excelente persona y amigo, no cabe duda que esta tesis no hubiera sido posible sin todas sus enseñanzas a lo largo de todos estos años. Quiero también agradecer la confianza que me dió desde mis primeros semestres como instructor en el Departamento de Histología, esto es algo que siempre le estaré agradecido por que me permitió continuar creciendo académicamente y desarrollar nuevas habilidades. Siempre admirare el gran trabajo que hace como encargado de instructores del Departamento de Histología al enseñarles el camino de la investigación.

Quiero agradecer a la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas y al Dr. C. José Juan Pérez Trujillo que fueron parte indispensable para la realización de esta tesis como Co-directora y Miembro de la Comisión respectivamente, muchas gracias por prestarme sus conocimientos y por todos los comentarios y consejos que me dieron a lo largo de la realización de esta tesis. Agradezco sobre todo las reuniones que tuvimos para los seminarios fueran presentados de la mejor manera posible.

Quiero agradecer especialmente al Dr. C. Daniel Salas Treviño quien ha estado al pendiente de mi formación desde hace más de cinco años y gracias a todo su apoyo ha sido posible que este trabajo fuera realizado. Muchas gracias por todos sus consejos, enseñarme prácticamente todo lo que sé sobre el laboratorio e introducirme al tema el cual le he dedicado estos últimos años de gran aprendizaje.

También quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Nano y Microestructuras del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey en especial al Dr. C. Flavio F. Contreras Torres por introducirme a un mundo completamente desconocido para mí, por prestarme sus conocimientos, por su paciencia y por permitirme trabajar en su laboratorio, fue una experiencia muy enriquecedora llena de muchas enseñanzas. Quiero agradecer también a los estudiantes del Dr. Flavio que me ayudaron durante mi estancia en el laboratorio Carlos y Ana y en especial a la Química Priscila por toda su ayuda, estar al pendiente de todo el proceso de síntesis y caracterización y por ayudarme a entrar al campus durante toda mi estancia en él, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de todas estas personas.

Agradezco a todos mis compañeros de Posgrado del Departamento de Histología por sus comentarios y consejos que me dieron durante estos dos años: Alejandra, Alfredo, Ana, Yareth y especialmente a mis grandes amigos: el M.C. Ulises Edgardo de León Covarrubias por acompañarme todo esta aventura de casi ocho años en el Departamento de Histología, desde ser instructores, becarios, pasantes, hasta estudiantes de Posgrado, gracias por compartir sus alimentos conmigo cuando sucedió la tragedia y la M.C. Gloria Arely Guillén Meléndez que forma parte de mi equipo de investigación y que contribuyó para que este trabajo fuera posible, gracias por compartir todos estos años en el equipo donde hemos aprendido muchas cosas juntos. Gracias por compartir todos estos momentos durante la maestría, sin ustedes estoy seguro de que los días hubieran sido más estresantes y no hubieran sido tan felices sin todas nuestras horas de comida, “breaks”, “chismesitos” y horas del café. A pesar de que nuestro camino se separa estoy seguro de que triunfarán ya que son excelentes docentes e investigadores y serán excelentes Doctores en Ciencias, les deseo el mejor de los éxitos.

Agradezco también a todos los profesores del Departamento de Histología que contribuyeron con mi enseñanza en especial al Jefe del Departamento el Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna. También agradezco a el Dr. Paolo, la Dra. Nelly, el Maestro Viktor los cuales tuve la fortuna de ser alumno y becario en sus grupos, muchas gracias por toda la confianza. Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. C. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo, siempre la he admirado por ser una excelente maestra y persona, no tengo palabras para describir lo que sus enseñanzas significaron para mí, ser su becario durante tres años en los que tuve la fortuna de apoyar, fue la primer maestra que me dio la confianza y con la cual me introdujo y descubrí mi amor por la docencia, estoy seguro de que vaya a donde yo vaya transmitiré sus conocimientos con amor y paciencia como usted me enseñó.

También quiero agradecer a todos los becarios del departamento que conocí a lo largo de todos estos años y los cuales también me ayudaron a crecer y aprender de ellos. Quiero agradecer especialmente a los becarios que formaron parte de mi equipo de investigación y que me dieron la oportunidad de enseñar y transmitir los conocimientos que he adquirido a lo largo de estos años, los estudiantes de medicina Alan Amado Méndez Pérez, Otoniel Alejandro González Barbosa y Marlene Andrea Luna Rubio, gracias por acompañarme durante esta etapa.

Finalmente quiero agradecer a las personas más importantes para la realización de este trabajo. Agradezco a las personas que me han acompañado y apoyado durante toda mi vida, mis padres Raymundo y Cristina, los amo, muchas gracias por siempre confiar en mí y apoyarme en todas las decisiones que he tomado, nunca podré pagar todo el amor y todo lo que me han dado, les agradeceré por siempre. Quiero agradecer de manera muy especial a Gaby mi novia, quien fue mi apoyo y acompañante desde el inicio hasta el final, en los momentos buenos y malos, en los momentos menos estresantes y en los más estresantes, muchas gracias por estar a mi lado incondicionalmente, este trabajo no hubiera sido posible sin todo su apoyo, gracias por estar junto a mí, te amo. También agradezco a sus padres Raúl y Mayra y su hermana Paty que al igual que ella también me apoyaron durante la realización de este proyecto, gracias por hacerme sentir parte de su familia y compartir estos momentos de logros juntos.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CÁNCER.....	1
1.2 TRATAMIENTOS EN EL CÁNCER.....	2
1.3 NANOTECNOLOGÍA.....	3
1.4 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs).....	5
1.4.1 GENERALIDADES DE LOS CNTs.....	5
1.4.2 SÍNTESIS DE LOS CNTs.....	6
1.4.3 TOXICIDAD DE LOS CNTs.....	6
1.4.4 FUNCIONALIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS CNTs.....	7
1.4.5 LOS CNTs COMO SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS.....	9
1.5 FÁRMACOS PLATINADOS.....	10
1.6 MUERTE CELULAR.....	11
1.6.1 GENERALIDADES DE LA MUERTE CELULAR.....	11
1.6.2 TIPOS DE MUERTE CELULAR.....	12
1.6.3 NPs Y MUERTE CELULAR.....	13
1.6.4 cCNTs Y MUERTE CELULAR.....	14
1.6.5 CNTs COMO SISTEMA DE ENTREGA DE CPT Y MUERTE CELULAR.....	15
1.7 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. OBJETIVO GENERAL.....	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 MATERIALES.....	21

5.1.1 REACTIVOS Y MATERIALES DE LABORATORIO.....	21
5.1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO.....	22
5.1.3 ESPECÍMENES DE ORIGEN BIOLÓGICO.....	23
5.2 MÉTODOS.....	23
5.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS NANOVECTORES.....	23
5.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS CNTS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDX).....	25
5.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS CNTs MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) Y ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.....	26
5.2.4 CULTIVO CELULAR.....	26
5.2.5 ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO MEDIANTE LOS ENSAYOS DE MTT Y TINCIÓN NUCLEAR DE DAPI.....	26
5.2.6 ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS IN VITRO MEDIANTE MICROSCOPIA DE LUZ E INMUNOFLUORESCENCIA.....	28
5.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DE LOS OxCNTs- HA-CPT.....	30
6.1.1 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LOS CNTs MEDIANTE SEM.....	30
6.1.2 EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LOS CNTs MEDIANTE EDX.....	31
6.1.3 EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CNTs MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FTIR Y ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.....	33
6.2 EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS OxCNTs-HA-CPT VS CÉLULAS TUMORALES.....	35
6.2.1 ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS CNTs VS LAS CÉLULAS TUMORALES Y NO TUMORALES MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT.....	35
6.2.2 ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS CNTs VS LAS CÉLULAS TUMORALES Y NO TUMORALES MEDIANTE LA TINCIÓN NUCLEAR CON DAPI.....	41

6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO APOPTÓTICO DE LA TERAPIA CON LOS OxCNTs-HA-CPT.....	46
6.3.1 ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE MUERTE CELULAR EN LA TERAPIA CON LOS CNTs.....	46
6.3.2 ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO EN LA TERAPIA CON LOS CNTs MEDIANTE LA DETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA.....	49
6.3.3 ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO EN LA TERAPIA CON LOS CNTs MEDIANTE LA DETECCIÓN DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN.....	54
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES.....	66
9. PERSPECTIVAS.....	66
10. BIBLIOGRAFIA.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los tipos de NPs utilizados en la nanomedicina.

Figura 2. Clasificación de los CNTs.

Figura 3. Caracterización de los CNTs por TEM.

Figura 4. Caracterización de los CNTs mediante FTIR y TGA.

Figura 5. Curvas de descomposición térmica de los CNTs.

Figura 6. Caracterización de los CNTs por SEM.

Figura 7. Caracterización de los cCNTs y OxCNTs-PEI por análisis EDX.

Figura 8. Caracterización de los OxCNTs-HA y OxCNTs-HA-CPT por análisis EDX.

Figura 9. Caracterización de los CNTs mediante Espectroscopía de Raman.

Figura 10. Caracterización de los CNTs mediante Espectroscopía FTIR.

Figura 11. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 12. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 13. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 14. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 15. Viabilidad relativa obtenida por el ensayo MTT.

Figura 16. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 17. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 18. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 19. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h.

Figura 20. Viabilidad relativa obtenida por la tinción nuclear DAPI.

Figura 21. Cortes semifinos tomados a 100x a la concentración de 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a las 24 h.

Figura 22. Porcentaje de células con cambios morfológicos de muerte celular.

Figura 23. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular no tumoral HEK293.

Figura 24. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular tumoral HeLa.

Figura 25. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular tumoral MDA-MB-231.

Figura 26. Gráficas obtenidas de la cuantificación de Caspasa-3a.

Figura 27. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular no tumoral HEK293.

Figura 28. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular tumoral HeLa.

Figura 29. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular tumoral MDA-MB-231.

Figura 30. Gráficas obtenidas de la cuantificación de células TUNEL positivas.

LISTA DE ABREVIATURAS

(Por orden de aparición)

NPs: Nanopartículas.

CNTs: Nanotubos de carbono.

SWCNTs: Nanotubos de carbono de pared simple.

MWCNTs: Nanotubos de carbono de pared múltiple.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

HUVECs: Células endoteliales de vena umbilical humana.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

HNO₃: Ácido nítrico.

-COOH: Grupo carboxilo.

C=O: Grupo carbonilo.

-OH: Grupo hidroxilo.

PEG: Polietilenglicol.

PEI: Polietilenimina.

HA: Ácido hialurónico.

DOX: Doxorrubicina.

CPT: Carboplatino.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

NF-κB: Factor Nuclear-Kappa B.

ATP: Adenosín trifosfato.

CaMKKβ: Proteína quinasa β dependiente de calmodulina.

AMPK: Proteína quinasa activada por adenosina 5'-monofosfato.

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero.

OxCNTs-HA-CPT: Nanotubos de carbono oxidados funcionalizados con HA y cargados con CPT.

TGA: Termogravimetría.

FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

cCNTs: Nanotubos de carbono comerciales.

OxCNTs-HA: Nanotubos de carbono oxidados funcionalizados con HA.

OxCNTs: Nanotubos de carbono oxidados.

H₃PO₄: Ácido fosfórico.

KMnO₄: Permanganato de potasio.

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDC HCl: Clorhidrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida.

NHS: N-hidroxisuccinimida.

OxCNTs-PEI: Nanotubos de carbono funcionalizados con PEI.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

EDX: Espectroscopia de rayos x de dispersión de energía.

ATR: Reflectancia total atenuada.

SFB: Suero fetal bovino inactivado.

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

TA: Temperatura ambiente.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

rpm: Revoluciones por minuto.

OsO₄: Tetróxido de osmio.

DE: Desviación estándar.

NCCD: Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular.

RCD: Muerte celular en muerte celular regulada.

ACD: Muerte celular accidental.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades en la que células de nuestro cuerpo comienzan a dividirse y diseminarse sin control, estas células anormales se desarrollan a partir de cualquier célula normal de nuestro cuerpo originando los diferentes tipos de cáncer (Sudhakar, 2009). Una complicación relevante del cáncer, es la metástasis, en la cual las células cancerígenas se diseminan a partir del tumor primario y migran a través del torrente sanguíneo y/o por los vasos linfáticos a otro sitio, para continuar con su crecimiento, y ocurre en cerca del 90% de las muertes por cáncer (Seyfried & Huysentruyt, 2013).

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global con una estimación de 18 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes, es decir una de cada seis muertes en el 2018 y es la primera causa de muertes prematuras en el mundo, afectando principalmente a personas entre los 30 y 69 años (IARC, 2020). En México, el cáncer es la tercer causa de muerte, solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares y complicaciones relacionadas con la diabetes, y se estima que cada año se diagnostican 128, 000 nuevos casos de cáncer en México (SMeO, 2016).

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer y en el 2018 se detectaron 2.1 millones de nuevos casos a nivel global, lo que representa 1 de cada 4 casos de cáncer entre las mujeres y también es la principal causa de muerte por cáncer en la mayoría de los países incluyendo México (IARC, 2020). Por otra parte, el cáncer de cérvix se ubica en el cuarto cáncer diagnosticado con mayor frecuencia con 570, 000 nuevos casos y 311, 000 muertes en el 2018, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar en términos de incidencia

y mortalidad en países con bajos índices de desarrollo humano solo por debajo del cáncer de mama (Bray et al., 2018).

1.2 Tratamientos en el cáncer

Las células cancerosas tienen ocho características distintivas: insensibilidad a las señales inhibitorias de la división celular, evadir la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular, metástasis, reprogramación metabólica y evasión al sistema inmunológico, lo que explica la complejidad de este grupo de enfermedades (Hanahan & Weinberg, 2011).

Debido a dicha complejidad, así como a los diferentes orígenes y tejidos afectados, el tratamiento del cáncer es muy diverso y variado por lo que en la actualidad se han desarrollado nuevas terapias para tratar de hacer frente a este grupo de enfermedades. El procedimiento quirúrgico (cirugía) fue el primer tipo de abordaje terapéutico que se utilizó para el cáncer, sin embargo, tiene muchas limitaciones y con frecuencia muchos de los tumores que se extirpaban regresaban con el paso del tiempo (Sudhakar, 2009).

Para contrarrestar estas recaídas tumorales, se han desarrollado diversos tipos de tratamiento que se utilizan solos o en combinación para eliminar las células cancerosas, las más utilizadas en la actualidad son la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia.

Posterior al descubrimiento de los rayos X en 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen, se estudiaron las propiedades de los elementos radiactivos para aplicarlos como tratamiento para el cáncer, dando origen a la radioterapia (Baskar et al., 2012).

En 1948 surge la quimioterapia, que consiste en la administración intravenosa de fármacos citotóxicos, en donde se observaron por primera vez los resultados de este tipo de tratamiento

contra el cáncer en humanos (Farber et al., 1948). Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos y la radioterapia tienen efectos adversos muy frecuentes y una alta toxicidad dado que también afecta a células no tumorales, por lo que su uso debe estar controlado, lo que sigue siendo un desafío para el tratamiento de este grupo de enfermedades (Livshits et al., 2014).

La inmunoterapia contra el cáncer incluye los inhibidores de puntos de control, y la terapia de células adoptivas para la activación del sistema inmune en reconocer y atacar a las células cancerígenas, este tipo de terapia también presenta efectos adversos recurrentes que varían según el tipo de inmunoterapia que se utilice (Kennedy & Salama, 2020).

1.3 Nanotecnología

Como se mencionó previamente, la aplicación de quimioterapia convencional presenta una gran diversidad de efectos adversos y una alta toxicidad, por lo que en los últimos años se han desarrollado estrategias basadas en la nanotecnología para tratar de disminuir dichos efectos tóxicos y reducir las largas estancias y los elevados gastos hospitalarios de los pacientes por la quimioterapia.

La nanotecnología se define como la ingeniería y fabricación de materiales a escala atómica y molecular, y según una definición más estricta se refiere al uso de estructuras con un diámetro aproximado entre 1 y 100 nanómetros (Farokhzad & Langer, 2009). La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el área médica y tiene como objetivo aprovechar el uso de estos nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de enfermedades, incluyendo el cáncer (Kim et al., 2010).

Dentro de las herramientas nanotecnológicas con mayor proyección en los últimos años se encuentran los nanosistemas de liberación de fármacos, estos se han utilizado para optimizar diversas terapias contra enfermedades como el cáncer y enfermedades crónicas e infecciosas (Mitchell et al., 2021). Los nanosistemas de liberación de fármacos son capaces de aumentar la biodisponibilidad de los fármacos quimioterapéuticos, otorgarles tropismo hacia células o tejidos específicos para la entrega de su carga permitiendo a la vez la disminución de los efectos adversos, (Rojas et al., 2016).

Los nanosistemas de liberación de fármacos están contruidos a partir de nanopartículas (NPs), las cuales pueden clasificarse por sus propiedades fisicoquímicas en NPs orgánicas como los liposomas, micelas poliméricas y dendrímeros, e inorgánicas como los nanotubos de carbono (CNTs), que han demostrado su gran capacidad de carga para acarrear una amplia diversidad de biomoléculas. (Bamrungsap et al., 2016) (Fig. 1). En la actualidad diversos tipos de NPs como los liposomas, las NPs de albumina y micelas poliméricas se estudian desde años atrás y han sido aprobadas para su uso en el tratamiento contra el cáncer (Shi et al., 2017).

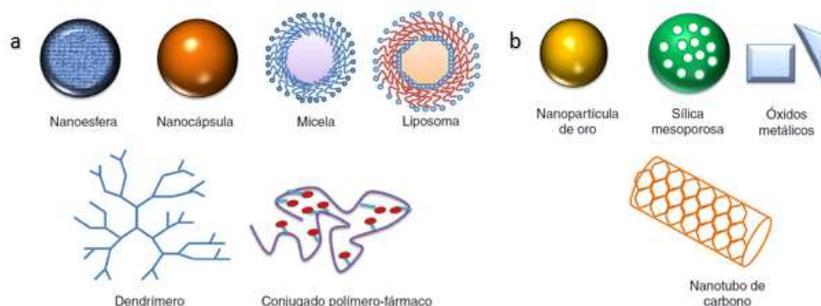


Fig. 1. Representación esquemática de los tipos de NPs utilizados en la nanomedicina. Se puede observar algunas de las NPs más utilizadas para la entrega de fármacos. a. NPs orgánicas como los liposomas y las micelas. b. NPs inorgánicas como los CNTs y las NPs de oro (Rojas et al., 2016).

1.4 Nanotubos de carbono (CNTs)

1.4.1 Generalidades de los CNTs

Los CNTs son estructuras formadas por láminas de grafeno enrolladas que fueron descritos por primera vez en 1991 (Iijima, 1991). Los CNTs se pueden clasificar dependiendo del número de láminas de grafeno que lo conforman: en CNTs de pared simple (SWCNTs) y en CNTs de pared múltiple (MWCNTs) (Gomez-Gualdrón et al., 2011)

Los SWCNTs consisten en una única lámina de grafeno enrollada con un diámetro que va desde los 0.4 hasta los 40 nm, mientras que los MWCNTs consisten en múltiples capas formando cilindros concéntricos con un diámetro que va desde los 2 hasta los 100 nm y con una distancia entre capas de 0.35 nm, según el enrollamiento de estas láminas de grafeno se pueden clasificar en zigzag, descansabrazos o nanotubos quirales (Negri et al., 2020) (Fig. 2).

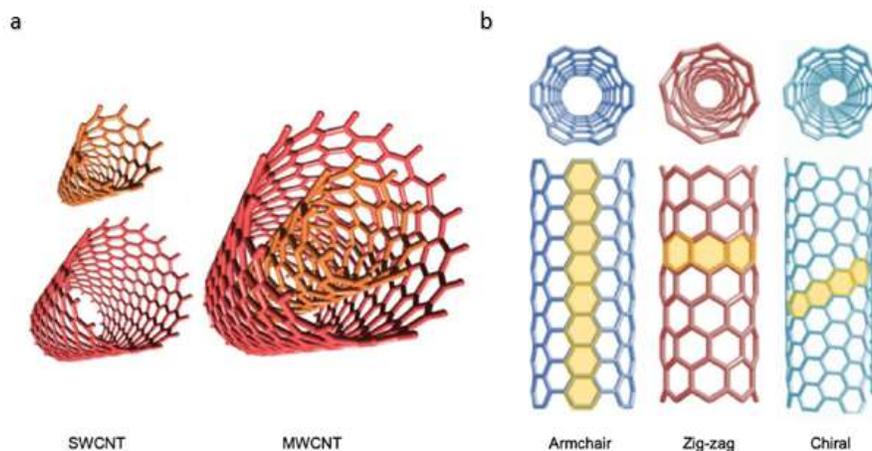


Fig. 2. Clasificación de los CNTs. Se muestra las dos clasificaciones de los CNTs. **a.** Clasificación por el número de láminas de grafeno, CNTs de pared simple (SWCNTs) y CNTs de pared múltiple (MWCNTs). **b.** Clasificación según el enrollamiento de las láminas de grafeno como descansabrazos, en zigzag y nanotubos quirales (Negri et al., 2020).

1.4.2 Síntesis de los CNTs

Existen diferentes métodos para la síntesis de los CNTs, los métodos más utilizados como el método de evaporización de arco de descarga, deposición de vapor químico y vaporización láser se utilizan para producir diferentes variedades de los CNTs (Awasthi et al., 2005).

En el método de evaporización por arco de descarga los CNTs se preparan creando un arco entre electrodos de grafito en una atmósfera inerte de argón o helio para generar las altas temperaturas necesarias para vaporizar los átomos de carbono para la síntesis de los CNTs a gran escala (Ebbesen & Ajayan, 1992).

La deposición de vapor químico es un método que consiste en pasar una fuente que tiene carbono, generalmente un gas sobre un metal de transición como el hierro, níquel o cobre sobre el cual se producirán los CNTs. Este método tiene diferentes ventajas como ser más reproducible, generación de productos más puros y la utilización de temperaturas más bajas (Mubarak et al., 2014).

En el método de vaporización láser se utiliza una mezcla de carbono y metales de transición, el carbono se vaporiza mediante la utilización de un láser que incide en un objetivo compuesto de metal grafito, permitiendo un mejor control en el tamaño, calidad y rendimiento para la síntesis de los CNTs (Guo et al., 1995).

1.4.3 Toxicidad de los CNTs

Existen múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran la toxicidad de los CNTs, en este sentido, se ha observado que diversos factores contribuyen a esta toxicidad como la cantidad y el tipo de impurezas metálicas derivados de su síntesis. Otros factores que modifican la

toxicidad de los CNTs son la longitud, la forma, el tipo de estos, así como el proceso de funcionalización empleado (Alshehri et al., 2016).

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad que tienen los CNTs en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando un aumento del estrés oxidativo y apoptosis en ensayos *in vitro* (Srivastava et al., 2011). Además, se ha demostrado la capacidad de los CNTs de incrementar la expresión de genes mitocondriales y desencadenar una disfunción mitocondrial en células epiteliales bronquiales humanas (Snyder et al., 2019).

Diversos estudios muestran alteraciones en la vía de la apoptosis con la disminución de la expresión de Bcl-2 y un aumento en la expresión de la Caspasa-3, además la inducción de la autofagia se incrementa en las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) expuestas a CNTs (Wu et al., 2020).

Así mismo, existen estudios que muestran la capacidad que tienen los CNTs de daño oxidativo del ADN a nivel cromosómico y a nivel nuclear en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, sin embargo, estos efectos solo se presentaron en dosis elevadas de CNTs es su estructura prístínica, es decir, sin ningún tipo de modificación estructural (Migliore et al., 2010).

1.4.4 Funcionalización y biocompatibilidad de los CNTs

Los CNTs presentan una baja solubilidad y una difícil manipulación en soluciones acuosas debido a su estructura fisicoquímica, sin embargo, pueden interactuar con diferentes compuestos a través de distintas reacciones químicas para aumentar su solubilidad y por ende, su utilización en sistemas biológicos (Akbar & Taimoor, 2009). Este proceso de funcionalización es un paso crítico para su integración en sistemas biológicos evitando la

formación de aglomerados que se forman por sus características hidrófobas (Yeo et al., 2017), los cuales son difíciles de degradar y ocasionan toxicidad crónica (Vardharajula et al., 2012).

Existen diferentes estrategias que se utilizan para la funcionalización de CNTs, los cuales se basan en dos tipos de enfoques: la funcionalización de superficie y la funcionalización de defectos (Fu & Sun, 2003). Uno de los métodos más utilizados para la funcionalización de los CNTs es la oxidación mediante el empleo de ácidos fuertes como el ácido sulfúrico (H_2SO_4) y el ácido nítrico (HNO_3) entre otros ácidos, con el fin de añadir grupos funcionales hidrofílicos a las paredes de los CNTs, como los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) e hidroxilo ($-\text{OH}$) (Morales-Torres et al., 2014).

Posteriormente estos grupos funcionales pueden ser conjugados con moléculas altamente hidrofílicas como el polietilenglicol (PEG) que tiene la capacidad de mejorar la dispersión de las partículas por repulsión electrostática (Yang et al., 2020). El PEG es inmunológicamente seguro y se utiliza ampliamente como molécula de funcionalización para diversos fármacos (Harris & Chess, 2003). La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico soluble en agua, que contiene grupos amino primarios, secundarios y terciarios, y puede ser utilizado en combinación con el PEG para aumentar la dispersión de los CNTs, minimizando la agregación de partículas (Farvadi et al., 2017).

Además de servir como mediador en la solubilidad, el PEG o la PEI funcionan también como sitios de reacción para unir moléculas específicas para mejorar el reconocimiento de los CNTs por parte de las células y tejidos diana y así, potenciar la captación de los fármacos para mejorar la eficacia terapéutica. Una de las moléculas bioespecíficas de las más estudiadas en la actualidad para esta finalidad es el ácido hialurónico (HA), que se compone

de unidades de D-glucurónico y el disacárido N-acetil-D-glucosamina. Este posee una alta biocompatibilidad, baja toxicidad al ser biodegradable y baja inmunotoxicidad (Liu et al., 2019). Además, el HA presenta propiedades de biodireccionamiento debido a su alta afinidad hacia su receptor celular (CD44), una glucoproteína de membrana que se encuentra sobreexpresada en células y tejidos tumorales, por lo que ha sido utilizado ampliamente como ligando de direccionamiento en diferentes sistemas de entrega de fármacos para incrementar sus efectos antitumorales (Song et al., 2017).

1.4.5 Los CNTs como sistema de entrega de fármacos

El mecanismo por el cual los CNTs entran a las células es principalmente por endocitosis. Sin embargo, se han encontrado diferentes vías de la endocitosis que están implicadas en la internalización de los CNTs como lo son la micropinocitosis, endocitosis mediada por caveolas y la endocitosis mediada por clatrina, esta última representa la vía de entrada más importante de los CNTs (Maruyama et al., 2015). Esta facilidad para atravesar las membranas celulares ofrece la oportunidad de ser utilizados como una prometedora estrategia para el sistema de entrega de fármacos (Marchesan et al., 2015).

Los CNTs tienen una estructura tubular, una superficie química funcional y una alta capacidad de carga de fármacos. Esta interacción de los fármacos puede ocurrir en diferentes sitios clave de los CNTs tanto en las láminas internas como en la superficie de las capas externas o en las ranuras formadas entre los contactos de los CNTs, y estas interacciones pueden ser de diferentes tipos como interacciones por puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, interacciones covalentes, entre otras (Mehra & Palakurthi, 2016).

Debido a que la administración de agentes quimioterapéuticos tiene múltiples limitaciones por su alta toxicidad y baja penetración celular, el desarrollo de un sistema de entrega de fármacos eficaz se convierte en una importante área de investigación (Prakash et al., 2011). En los últimos años se ha demostrado la capacidad que tienen los CNTs como acarreadores de diversos fármacos quimioterapéuticos para el sistema de entrega de fármacos como la doxorubicina (DOX) y el carboplatino (CPT) (Guo et al., 2017).

1.5 Fármacos platinados

Los metales son esenciales para diversos procesos bioquímicos en los organismos vivos, estos presentan características únicas como reacciones oxidación-reducción, modos de coordinación variable y reactividad hacia sustratos orgánicos, por lo que los convirtió en objetivos muy atractivos para el tratamiento contra el cáncer (Frezza et al., 2010).

Los fármacos platinados como el cisplatino, CPT y oxaliplatino son antineoplásicos ampliamente utilizados contra diversos tipos de cáncer (Dilruba & Kalayda, 2016). El efecto antineoplásico de los fármacos platinados como terapia contra el cáncer fue demostrada por primera vez en 1969 por Barnett, quien utilizó el cisplatino en un modelo de sarcoma en ratones (Rosenberg et al., 1969).

El mecanismo de acción de los compuestos platinados como el cisplatino, está dado por su capacidad para formar aductos entrecruzados dentro de las hebras de ADN que activan la transducción de señales que involucran a ATR, p53, p73 y MAPK, que culminan con la activación de la apoptosis (Siddik, 2003).

El CPT es un compuesto platinado de segunda generación, que se utiliza ampliamente en la terapia contra el cáncer; y además de utilizarse en diversos tipos de cáncer que responden al

cisplatino, se utiliza en pacientes cuyo tratamiento estuvo limitado por la neurotoxicidad y nefrotoxicidad inducida por el cisplatino (Van der Vijgh, 1991).

Desafortunadamente, los fármacos platinados tienen una alta toxicidad y numerosos efectos adversos como lo son la ototoxicidad, neuropatía periférica, nefrotoxicidad y mielosupresión como los efectos más graves; además de náuseas, vómitos y alopecia entre otros (Rabik & Dolan, 2007). Estos efectos adversos se deben a que los compuestos platinados no son específicos contra las células cancerosas, si no que afectan (en menor grado) a todas las células a nivel sistémico (Florea & Büsselberg, 2011).

1.6 Muerte celular

1.6.1 Generalidades de la muerte celular

La muerte celular es un proceso de suma importancia para la salud en los organismos multicelulares, a lo largo de la vida del ser humano se producen más de un millón de células por segundo, por lo tanto, el mismo número de células se elimina para mantener un equilibrio. Todo esto se logra gracias a la activación de diversos mecanismos moleculares que conducen a las células a la muerte celular (Strasser & Vaux, 2020).

Generalmente existen dos mecanismos por lo que las células mueren: la apoptosis en la cual la célula muere de manera programada y predeterminada, y la necrosis, en la cual la célula muere de manera accidental, repentina e inflamatoria. Además, existen muchos otros tipos de muerte celular parecidas a la apoptosis o necrosis o diferentes a estas, y todas se encargan de diferentes funciones que tienen como objetivo mantener la homeostasis (Nirmala & Lopus, 2020).

1.6.2 Tipos de muerte celular

La apoptosis (del griego, que significa caída o desprendimiento), es un término introducido en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie en la que se describe una forma de muerte morfológicamente diferente a la muerte celular necrótica (Kerr et al., 1972). Existen dos vías principales por las cuales puede iniciar la apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca, ambas vías se caracterizan por la activación de una serie de serina proteasas que se conocen como Caspasas (Martin, 2014).

La vía extrínseca se caracteriza por ser iniciada por receptores de muerte que pertenecen a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), cuando los ligandos de muerte interactúan con estos receptores se transmiten señales de muerte a través de los dominios citoplasmáticos (Xu et al., 2019). La vía intrínseca se encuentra regulada por la familia de proteínas Bcl-2, que una vez que se inicia un estímulo por moléculas pro-apoptóticas, provoca la liberación del citocromo C presente en el espacio intermembrana de las mitocondrias hacia el citoplasma para iniciar una cascada de señalización que provoca la activación de las Caspasas (de Mello Gomes et al., 2019).

Por otro lado, la necrosis es un tipo de muerte que es inducida por una lesión externa y se caracteriza por la ruptura de la membrana celular, un proceso inflamatorio importante, daño tisular y/o un aumento de volumen celular que se conoce como oncosis. Este tipo de muerte provoca la liberación de varias proteínas y compuestos proinflamatorios como el factor nuclear- κ B (NF- κ B), que provoca los eventos antes descritos (D'Arcy, 2019).

La autofagia (del griego, que significa comerse a uno mismo), es un proceso que permite el mantenimiento de una homeostasis metabólica de las fuentes de energía en diversos

momentos del desarrollo y en respuesta al estrés nutricional, este proceso desempeña un importante papel en la eliminación de proteínas mal plegadas, degrada organelos envejecidos o no funcionales y la eliminación de patógenos intracelulares (Glick et al., 2010). Existen tres formas básicas de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas, que se diferencian principalmente por la forma en que se entregan los componentes citosólicos a los lisosomas (Sridhar et al., 2012).

1.6.3 NPs y muerte celular

Las NPs se sintetizan a partir de diversos elementos tales como carbono, sílice, oro, plata, titanio entre muchos otros. Además de su composición, las NPs muestran efectos citotóxicos dependiendo de su tamaño, la carga, la concentración, la funcionalización, el estado de dispersión, entre otras (Ray et al., 2009).

Algunas NPs tienen la capacidad de generar ROS e inducir vías de señalización para regular la autofagia (Moosavi et al., 2016), además de provocar la activación de diversas vías relacionadas con la necrosis y la apoptosis (Davis et al., 2008).

Por otra parte, otras NPs como las de oro tienen la capacidad de alterar la homeostasis celular, al interactuar con la membrana celular mediante la atracción electrostática, provocando cambios morfológicos que se consolidan en necrosis (Goodman et al., 2004). Las NPs de carbono también provocan cambios relacionados con la necrosis como lo son ruptura de los lisosomas, generación de ROS, liberación de catepsina B y reducciones en el nivel intracelular de ATP (Yuan et al., 2020).

Existen otra clase de NPs como las formuladas de selenio que ejercen sus efectos citotóxicos al aumentar la expresión de Bax y Caspasa-9 escindida, además de disminuir la expresión de

Bcl-2 activando la vía intrínseca de la apoptosis (Cui et al., 2019). Mientras que otras como las NPs de zinc desencadenan la apoptosis mediante la activación de la vía extrínseca al activar al receptor Fas (CD95), miembro de la familia de TNF (Saravanakumar et al., 2018).

La activación de la autofagia es un proceso importante para evaluar la citotoxicidad de las NPs, así como su potencial actividad terapéutica. Se ha demostrado que las NPs de óxido de hierro super magnéticas tienen la capacidad de inducir autofagia mediante la activación de TLR4, fosforilando p38 y translocando Nfr2 aumentando la expresión de p62 (Jin et al., 2019). Así mismo, se ha encontrado que el uso de las NPs de plata regulan la autofagia mediante la activación de la proteína quinasa β dependiente de calmodulina (CaMKK β) y la proteína quinasa activada por adenosina 5'-monofosfato (AMPK), lo que provoca una regulación a la baja de diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Li et al., 2019).

1.6.4 CNTs y muerte celular

Estudios recientes han demostrado que los CNTs tienen la capacidad de inhibir la viabilidad celular, promover la apoptosis, suprimir la migración celular debido a un daño estructural al citoesqueleto de actina, inhibir la actividad de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de (Zhang et al., 2020), además de inducir una forma especializada de la autofagia que se conoce como mitofagia en estudios *in vitro* (Snyder et al., 2019).

Otro efecto nocivo celular que se ha observado relacionado al uso de CNTs es el aumento de las ROS a nivel mitocondrial (Salehcheh et al., 2020), y esta misma elevación de las ROS a nivel celular acompañado de disminución de la autofagia, disminuyen las proteínas LC3, beclin-1 y ATG5 en estudios *in vitro* (Wu et al., 2020).

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de los CNTs en estudios *in vivo* en un modelo murino, y se detectó que había una activación de la apoptosis a través de la sobreexpresión de Bax y Caspasa-3 y la subexpresión de Bcl-2 en los grupos tratados con CNTs (Kavosi et al., 2018).

1.6.5 CNTs como sistema de entrega de CPT y muerte celular

El uso de los CNTs para la entrega de CPT mostró un mayor porcentaje de células apoptóticas en comparación con los CNTs sin el fármaco, y que la existía un efecto dosis dependiente en el análisis de viabilidad por citometría de flujo con el uso de Anexina V y yoduro de propidio en un estudio *in vitro* (Arlt et al., 2010).

En un estudio *in vitro* se demostró como los CNTs funcionalizados cargados con CPT inducen una sobreexpresión de beclin-1 y la disminución de la expresión de Bcl-2 desencadenado muerte celular mediada por autofagia (Balas et al., 2016).

1.7 Antecedentes directos

Nuestro equipo de trabajo ha desarrollado y caracterizado un nanovector funcionalizado con HA y cargado con CPT (OxCNTs-HA-CPT) con actividad citotóxica específica *in vitro* frente a células tumorales murinas TC-1, mientras que en células murinas no tumorales NIH-3T3 muestra un efecto citotóxico menor (Salas-Treviño et al., 2019). Además, el nanovector funcionalizado se probó en células tumorales humanas HeLa y MDA-MB-231 demostrando efectos similares que los observados en las células murinas (Leyva-González et al., 2021).

Para la caracterización de nuestro nanovector se realizaron los métodos de termogravimetría (TGA), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) para la visualización y determinación de la composición

orgánica cuantitativa y semicuantitativa, esto para observar las diferentes modificaciones estructurales y fisicoquímicas en los CNTs.

En este sentido se demostró mediante TEM cómo los CNTs comerciales (cCNTs) y los CNTs oxidados y funcionalizados con HA (OxCNTs-HA) presentaban diferencias en términos de dispersión, estructura y apariencia. Los OxCNTs-HA mostraron una buena dispersión, mayor solubilidad y con una morfología recta, lo que indica una buena interacción con el medio acuoso (Fig. 3a), a diferencia de los cCNTs que mostraron un bajo nivel de dispersión en medio acuoso, al encontrarse aglomerados de cCNTs y con una morfología enrollada y curvada (Fig. 3).

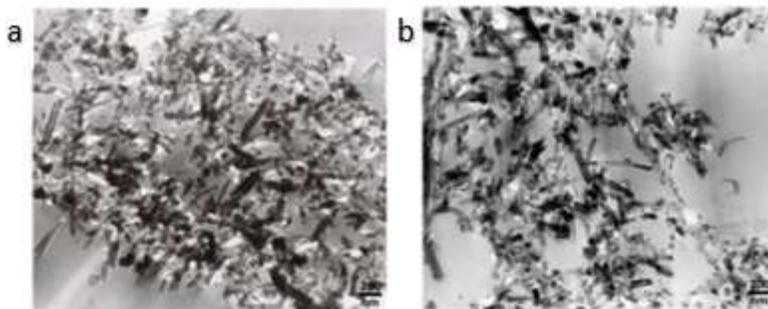


Fig. 3. Caracterización de los CNTs por TEM. Se observan micrografías electrónicas de transmisión correspondientes a los cCNTs (a) y los OxCNTs (b).

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante FTIR mostraron los espectros infrarrojos de los cCNTs y de OxCNTs-HA, en donde estos últimos mostraron una característica espectral en el número de onda de 1400-1800 cm^{-1} , en esta región se observó un pico en el número de onda 1700 cm^{-1} , que corresponde con un grupo carboxilo de la amida I del HA, con lo que podemos inferir su correcta funcionalización con HA. Además, se visualizaron dos picos en

los números de onda 1584 cm^{-1} y 1498 cm^{-1} que corresponden a los polímeros bencénicos que presentan dobles enlaces de carbono, los cuales son característicos de la estructura grafénica de los cCNTs (Fig. 4B).

En el análisis mediante TGA se observó una pérdida de peso de aproximadamente 10%, que corresponde a la descomposición de los restos orgánicos del HA y de los CNTs, esta descomposición total del HA se observó a 366°C, lo que corresponde a una pérdida de peso abrupta del 2.5 % aproximadamente (Fig. 4c). Se analizaron las construcciones cCNTs, OxCNTs y OxCNTs-HA donde se observó la descomposición térmica, las curvas de escaneo diferencial calorimétrico de las distintas construcciones de CNTs con lo que se demuestra que cada una de las construcciones tiene una naturaleza orgánica diferente (Fig. 5).

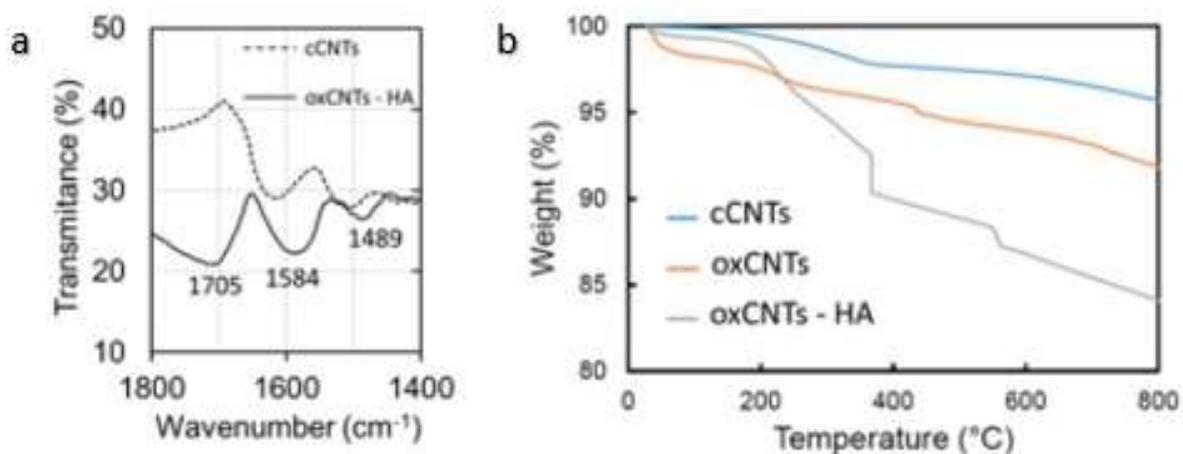


Fig. 4. FTIR y TGA. Se muestran los resultados obtenidos mediante FTIR y TGA. b. Espectroscopia infrarroja línea punteada corresponde al espectro de los cCNTs y a línea continua corresponde al espectro de OxCNTs-HA. c. TGA, la línea azul corresponde a los cCNTs, la línea naranja a los OxCNTs y la línea gris a los OxCNTs-HA

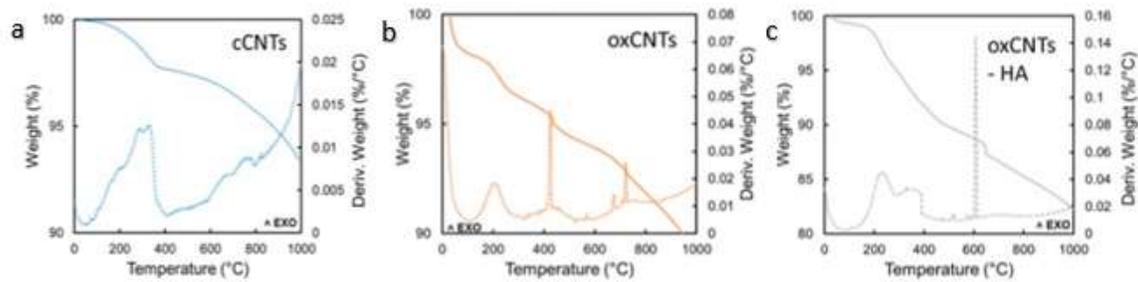


Fig. 5. Curvas de descomposición térmica. Se muestran las curvas de descomposición térmica (peso absoluto, línea continua) y de escaneo diferencial calorimétrico (peso derivado, línea punteada) de los diferentes nanovectores: a. cCNTs, b. OxCNTs y c. OxCNTs-HA.

Estos resultados obtenidos por nuestro equipo de investigación son prometedores y demuestran la correcta funcionalización de nuestro sistema. Además, se ha observado que los efectos citotóxicos son específicos contra células tumorales murinas, sin embargo, los mecanismos de muerte involucrados con nuestro vector gráfenico aún no han sido estudiados, lo cual es importante en términos de establecer la naturaleza del efecto citotóxico inducido por dicho vector, tanto en las células tumorales como en las no tumorales, por lo que en este estudio nos dedicamos a investigar las vías de muerte celular involucradas en la citotoxicidad ejercida por nuestro sistema en modelos celulares *in vitro*.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública encabezando las listas de morbilidad y mortalidad a nivel global y en nuestro país.

En la quimioterapia, los compuestos platinados presentan una alta toxicidad y una baja especificidad contra las células tumorales, provocando una gran variedad de efectos secundarios.

Debido a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la lucha contra el cáncer, el uso de los CNTs como sistema de entrega de fármacos ha demostrado resultados prometedores en los últimos años.

En nuestro equipo de trabajo estamos desarrollando un nanovector para la entrega de CPT de manera segura y eficaz. Por lo que, consideramos importante determinar su especificidad contra células tumorales humanas y si este induce su efecto citotóxico mediado por apoptosis.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el nanovector biodirigido cargado con CPT presenta citotoxicidad específica contra células tumorales humanas y si este efecto es mediado por apoptosis.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar el nanovector biodirigido cargado con carboplatino (CPT).
2. Evaluar la especificidad citotóxica del nanovector biodirigido cargado con CPT contra células tumorales humanas.
3. Determinar si el nanovector biodirigido cargado con CPT induce apoptosis en células tumorales humanas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos y materiales de laboratorio

- CNTs de pared múltiple: Graphitized MWNT–COOH, 5 g, 50-80 nm diámetro, 10-20 μm de longitud, Stock: #1245YJF, CAS: #99685-96-8, Lot: 1245-071510. Nanostructured & Amorphous Materials Inc. ® (Houston, Texas, EE. UU.)
- Ácido sulfúrico ACS, (H_2SO_4), CTR Scientific®
- Ácido fosfórico ACS, (H_3PO_4), CTR Scientific®
- Permanganato de potasio ACS, (KMnO_4), Scientific®
- Agua destilada
- Acetona grado reactivo, (CH_3COCH_3), CTR Scientific®
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado reactivo, ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), Sigma-Aldrich®
- Clorhidrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida, Sigma-Aldrich®
- N-hidroxisuccinimida, Sigma-Aldrich®
- Polietilenimina, Sigma-Aldrich®
- Sal sódica del ácido hialurónico (HA) de *Streptococcus equi*, Sigma-Aldrich®
- Acetato de etilo, ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), Sigma-Aldrich®
- Alcohol etílico RA, CTR Scientific®
- Carboplatino (CPT), Sigma-Aldrich®
- Medio de cultivo celular DMEM alto en glucosa 1X, Sigma-Aldrich ®
- Suero fetal bovino (SFB) para cultivo celular, Corning®
- Tabletas de Buffer de fosfatos salino (PBS) 1X (pH 7,4), Sigma-Aldrich®

- Tripsina 1X, Corning®
- Caspase-3 p11 (C-6): sc-271759, Santa Cruz Biotechnology®
- Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 555, Invitrogen®
- TACS® 2 TdT-Fluor In Situ Apoptosis Detection Kit

5.1.2 Equipos de laboratorio

- EVO LS Scanning Electron Microscope (SEM) for Life Science Research from Carl Zeiss®
- FT-IR: Modelo Spectrum One, Perkin Elmer®
- Raman: Modelo Cora 5500, Anton Paar®
- Placa magnética de laboratorio
- Ultrasonicador Transonic 420 Elma-LabLine®
- Potenciómetro UltraBasic UB-10, Denver Instruments®
- Agitador Vórtex, Daigger Genie 2, A. Daigger Corporation®
- Microscopio de luz, Nikon Eclipse 50i, Nikon®
- Cámara para microscopio, Q Imaging®
- Microscopio de fluorescencia, Laica DM 1000, Laica®
- Cámara para microscopio Olympus Infinity, Olympus®
- Centrífuga SORVALL ST16, Thermo Scientific®
- Centrífuga Eppendorf 5415 C, Eppendorf®
- Balanza analítica Serie GR, A&D weighing®

5.1.3 Especímenes de origen biológico

Línea celular HEK-293: Células epiteliales de riñón humano (ATCC® CRL-1573, Manassas, Virginia, EE. UU.)

Línea celular HeLa: Células epiteliales de adenocarcinoma cervicouterino humanas (ATCC® CCL-2, Manassas, Virginia, EE. UU.)

Línea celular MDA- MB- 231: Células epiteliales de adenocarcinoma de mama humanas (ATCC® HTB-26, Manassas, Virginia, EE. UU.)

5.2 Métodos

5.2.1 Construcción de los nanovectores

Los CNTs de pared múltiple Graphitized MWNT–COOH (cCNT) fueron obtenidos de la casa comercial Nanoamor® (Stock: #1245YJF, CAS: #99685-96-8), con una pureza del 99.9%, diámetro entre 50 y 80 nm y longitud de 10 a 20 μm .

Los cCNTs se oxidaron mediante el tratamiento con ácidos concentrados, agentes oxidantes y calor para aumentar el número de grupos carboxilo (-COOH) y grupos hidroxilo (-OH) en su superficie (Chen et al., 2008). Para esto se preparó una solución de 16 mL con 14 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 2 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4), a la que, además se le agregaron 200 mg de permanganato de potasio (KMnO_4) y se dejó reaccionar durante 5 min. en agitación magnética a 110 °C, después se agregaron 40 mg de cCNTs y se elevó la temperatura a 125°C y se dejaron en agitación durante 24 h. Posteriormente se desactivó el permanganato de potasio con 3 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los OxCNTs resultantes se separaron por centrifugación y se realizaron lavados con agua destilada hasta

llegar a un pH de 7. Finalmente, los OxCNTs se resuspendieron en 6 mL de acetona y se transfirieron a un vial de vidrio para colocarse en un horno a 60°C durante 48 h.

Una vez oxidados, los OxCNTs son sometidos a un proceso de funcionalización, para esto se pesaron 30 mg de OxCNTs y se les añadieron 12 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Esta suspensión se sonicó a una frecuencia de 36 kHz durante 30 min. y se colocó en una plancha de agitación magnética, se preparó una solución activadora con 30 mg de Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida (EDC HCl), 15 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) disueltos en 1.5 mL de DMSO, este último reactivo se añadió por goteo y se dejó reaccionar durante 3 h con los OxCNTs, después se añadieron por goteo 0.5 mL de solución de polietilenimina (PEI, 20 mg en 2 mL de DMSO) como agente acoplador y se dejó en agitación magnética durante 48 h. Posteriormente los OxCNTs-PEI se separaron por centrifugación y se realizaron 5 lavados con agua destilada. Finalmente, los OxCNTs-PEI se resuspendieron en 6 mL de acetona y se transfirieron a un vial de vidrio para colocarse en un horno a 60°C durante 48 h.

El proceso de funcionalización se completó con la unión del HA, para esto, se pesaron 30 mg de OxCNTs-PEI y se resuspendieron nuevamente en 12 mL de DMSO, esta suspensión se sonicó a una frecuencia de 36 kHz durante 30 min. y se colocó en una plancha de agitación magnética, se preparó nuevamente la solución activadora con 30 mg de EDC HCl, 15 mg de NHS disueltos en 1.5 mL de DMSO, ésta se añadió por goteo y se dejó reaccionar durante 3 h con los OxCNTs-PEI. Simultáneamente en un vaso de precipitado se preparó una solución de HA (30 mg en 2.5 mL de DMSO) y se le añadió una solución activadora de EDC HCl (30 mg EDC HCl en 1.2 mL de DMSO) y se dejó reaccionar durante 3 h. Posteriormente la solución de HA se añadió por goteo a los OxCNTs-PEI y se dejó en agitación magnética

durante 48 h, después los OxCNTs-HA se separaron por centrifugación y se realizaron 5 lavados con agua destilada. Finalmente, los OxCNTs-HA se resuspendieron en 6 mL de acetona y se transfirieron a un vial de vidrio para colocarse en un horno a 60°C durante 48 h. Como paso final, se incorporó el CPT en los OxCNTs-HA con el método de nano extracción previamente descrito (Li et al., 2019). Para esto se pesaron 5 mg de OxCNTs-HA y 5 mg de CPT y se agregaron a 2 mL de acetato de etilo, esta suspensión se sonicó a una frecuencia de 36 kHz durante 30 min., se dejó en agitación magnética durante 48 h, luego los OxCNTs-HA-CPT se separaron mediante centrifugación y se realizaron 3 lavados en una solución 3:1:1 de acetato de etilo, etanol absoluto y agua destilada respectivamente, posteriormente, se resuspendieron en 6 mL de acetona y se transfirieron a un vial de vidrio para colocarse en un horno a 60°C durante 48 h.

5.2.2 Caracterización de los CNTs mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos x de dispersión de energía (EDX)

Para evaluar la morfología estructural y superficial de las diferentes construcciones se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos x de dispersión de energía (EDX) para conocer la composición elemental de las diferentes construcciones, se utilizó un microscopio EVO LS Scanning Electron Microscope (Carl Zeiss®). Para estas técnicas, se colocaron 5 mg de cada construcción en un tubo de microcentrífuga y se añadió 1 mL de alcohol isopropílico, se sometieron a sonicación a una frecuencia de 36 kHz durante 30 min. posteriormente se tomaron 100 µL de la muestra y se dejaron caer sobre el porta muestra, se dejó evaporar el alcohol y el porta muestras se recubrió con oro para realizar el análisis. Para determinar la composición elemental de nuestras construcciones se realizó un análisis de EDX.

5.2.3 Caracterización de los CNTs mediante Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de Raman

Para demostrar la correcta funcionalización química de nuestras construcciones se realizó una caracterización mediante FTIR para un análisis cualitativo de los grupos funcionales de los CNTs, los espectros se registraron en un espectrofotómetro Spectrum One FTIR (PerkinElmer®, Shelton, CT, EE. UU.) mediante la reflectancia total atenuada (ATR). Se colocaron 10 mg de las construcciones en sólido para realizar los análisis. Para el análisis por espectroscopía de Raman se utilizó el Modelo Cora 5500, Anton Paar®, se colocaron en un recipiente 10 mg de las construcciones en sólido antes de la medición.

5.2.4 Cultivo celular

Para este estudio se utilizaron tres líneas celulares humanas: embrionarias de riñón HEK-293, y dos líneas tumorales: adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y adenocarcinoma de cérvix HeLa. Las tres líneas utilizadas fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) y se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

5.2.5 Análisis de citotoxicidad *in vitro* mediante los ensayos de MTT y tinción nuclear de DAPI

Para obtener el tiempo y la concentración en el que se utilizaron nuestros tratamientos se realizaron dos ensayos: el primero de ellos fue el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para obtener la viabilidad indirecta a través de la medición de la actividad mitocondrial. Este se basa en la utilización de las sales de tetrazolio que son reducidas por las reductasas mitocondriales a formazán (Kumar et al., 2018). Para

esto se incubaron $7,5 \times 10^3$ células por pozo ($n=7$) en una placa de 96 pozos, se dejaron adherir durante 24 h y posteriormente se aplicaron los tratamientos de cCNTs, OxCNTs, OxCNTs-HA, OxCNTs-HA-CPT y como control positivo el fármaco quimioterapéutico CPT, a cinco diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 y 48 h. Después del tiempo establecido se agregaron 15 μL de MTT a cada pozo y se incubaron durante 2 h a 37°C , posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadieron 150 μL de revelador de MTT (HCl 4 mM, 0.040% NP40 en Isopropanol), la placa se colocó en agitación magnética durante 15 min. a temperatura ambiente (TA) antes de su lectura en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm, para así obtener el porcentaje de viabilidad relativa.

Para corroborar los datos obtenidos con el ensayo de MTT, se realizó el análisis con DAPI a través del porcentaje de células adheridas mediante la tinción nuclear con la sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Chazotte, 2011). Se utilizaron las mismas condiciones que para el ensayo de MTT en placas de 96 pozos, después de los tratamientos se realizaron 2 lavados con 400 μL de PBS 1X y las células se fijaron con una mezcla de metanol acetona 1:1 durante 20 min. a 4°C . Posteriormente se retiró el fijador y se realizó nuevamente un lavado con 400 μL de PBS 1X, se añadieron 100 μL de DAPI (100 ng/mL) y se incubaron durante 20 min. a TA en oscuridad. Finalmente se retiró el DAPI y la placa se observó en un microscopio de fluorescencia Laica DM 1000, Laica®, se tomaron fotografías y las imágenes fueron analizadas por el software imageJ en su versión 1.52, donde se midió el porcentaje de área cubierta para determinar la cantidad de células adheridas a la placa.

5.2.6 Análisis de la apoptosis *in vitro* mediante microscopia de luz e inmunofluorescencia

Para analizar cambios morfológicos característicos de muerte celular se realizaron cortes semifinos. Para esto se sembraron 1×10^6 células en una placa de 60 mm, se dejaron adherir durante 24 h y se aplicaron los tratamientos previamente descritos, se dejaron durante 24 h para luego cosechar las células mediante tripsinización. Se resuspendieron las células en un tubo de microcentrífuga y luego las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % durante una hora, posteriormente se centrifugaron a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Después de retirar el fijador las células se lavaron en buffer de cacodilatos, nuevamente se centrifugaron a 14,000 rpm y se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 30 min., se realizó la técnica convencional de MET y se realizaron cortes semifinos mediante ultramicrotomía. Finalmente, los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se observaron en un microscopio de luz de campo claro. En el análisis morfológico se analizaron los cambios en el núcleo, la condensación de la cromatina y la vacuolización en el citoplasma. Se obtuvo el porcentaje de células con cambios morfológicos de muerte celular contando las células presentes en 8 campos a 100x divididas entre el número de células con cambios morfológicos de muerte celular.

Para correlacionar lo encontrado en los cortes semifinos se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Para esto se sembraron 5×10^4 células por pozo en una placa de 24 pozos que contenía cubreobjetos redondos en el fondo, se dejaron adherir durante 24 h y se aplicaron los diferentes tratamientos previamente descritos y se incubaron durante 24 h. Luego las células se fijaron con acetona durante 10 min. a 4°C , se permeabilizaron con 400 μL de PBS 1x-Triton X-100, y se bloquearon las proteínas con suero de caballo al 10% por

30 min., se retiró el sobrenadante y se añadió un anticuerpo primario anti-Caspasa 3 activa para apoptosis y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Finalmente se lavaron con 400 µL de PBS 1x y se retiraron los cubreobjetos redondos y se montaron con glicerol en una laminilla. Para demostrar la fragmentación nuclear que sucede durante la apoptosis se realizó el ensayo de TUNEL con TACS® 2 TdT-Fluor In Situ Apoptosis Detection Kit siguiendo las instrucciones del fabricante y las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia Laica DM 1000, Laica®. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software imageJ en su versión 1.52 donde se realizó un análisis de área para Caspasa-3a y un conteo de células TUNEL positivas que se obtuvo contando todos los núcleos/el número de células TUNEL positivas en 8 campos a 40x.

5.2.7 Análisis estadístico

Estadística descriptiva: Las variables cuantitativas se realizaron mediante el cálculo de la media y como medida de dispersión, se utilizó la desviación estándar (DE).

Estadística inferencial: Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk para evaluar la distribución de los datos. Para las variables que presentaron una distribución normal se realizó una prueba de ANOVA de dos vías, además de una prueba de comparación múltiple de Tukey para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización morfológica y fisicoquímica de los OxCNTs-HA-CPT.

6.1.1 Evaluación de la morfología de los CNTs mediante SEM

Durante la oxidación, funcionalización y encapsulación del CPT ocurren cambios en la composición de los CNTs en los diferentes procesos a los que son sometidos, estos cambios pueden ser estudiados mediante diferentes técnicas morfológicas y analíticas. Uno de los cambios mencionados son los morfológicos, que pueden ser evaluados mediante SEM.

Se analizaron los cambios morfológicos de las diferentes construcciones de CNTs: los cCNTs muestran una morfología tubular de gran longitud con formación de curvaturas pronunciadas, además de una estructura superficial lisa (Fig. 6A). Por otro lado, los OxCNTs muestran una morfología tubular con una longitud menor, con una disminución en la formación de las curvaturas pronunciadas, además de mostrar una estructura superficial ligeramente rugosa debido a los grupos funcionales adicionados durante el proceso de oxidación (Fig. 6B).

Por otra parte, los OxCNTs-HA (Fig. 6C) y los OxCNTs-HA-CPT (Fig. 6D) siguen conservando su forma tubular con longitud corta y sin formación de curvaturas pronunciadas, además de una estructura superficial rugosa debido a la incorporación de las moléculas orgánicas durante el proceso de funcionalización.

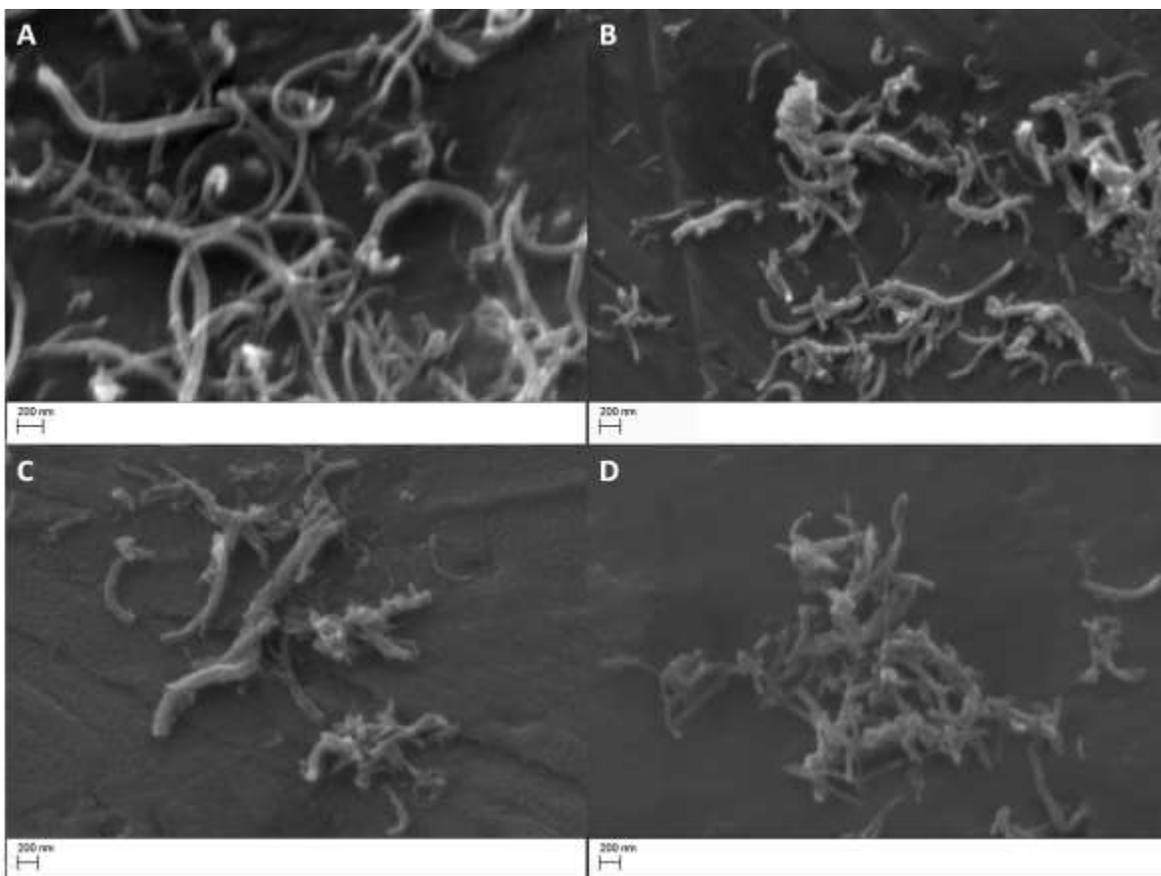


Fig. 6. Caracterización de los CNTs por SEM. A) Nanotubos de carbono comerciales (cCNTs), B) Nanotubos de carbono oxidados (OxCNTs), C) Nanotubos de carbono oxidados funcionalizados con hialuronato (OxCNTs-HA), D) Nanotubos de carbono oxidados funcionalizados con hialuronato y cargados con carboplatino (OxCNTs-HA-CPT). EHT = 25.00 Kv, Mag = 20.00 K X.

6.1.2 Evaluación de la composición elemental de los CNTs mediante EDX

Después de cada paso de funcionalización es importante conocer los cambios en la composición elemental que suceden en la superficie para confirmar una correcta incorporación de las moléculas orgánicas. Primero analizamos los cCNTs (Fig. 7A) donde se muestra cómo casi un 95% de la masa está conformada por carbono y un 5% de oxígeno presente en los grupos carboxilo, a diferencia de los observado en los OxCNTs-PEI (Fig. 7B)

donde existe un aumento de tres veces la cantidad de oxígeno, además de que aparece la presencia de casi 10% de nitrógeno, átomo presente en los grupos amino de la molécula de PEI.

Por otra parte, al analizar los OxCNTs-HA (Fig. 8A) observamos cómo ocurre un aumento en la cantidad de oxígeno a 26% de la masa total, además de una disminución de casi la mitad de nitrógeno. Finalmente, al analizar los resultados de los OxCNTs-HA-CPT (Fig. 8B) podemos observar la presencia de platino, átomo presente en la molécula de CPT.

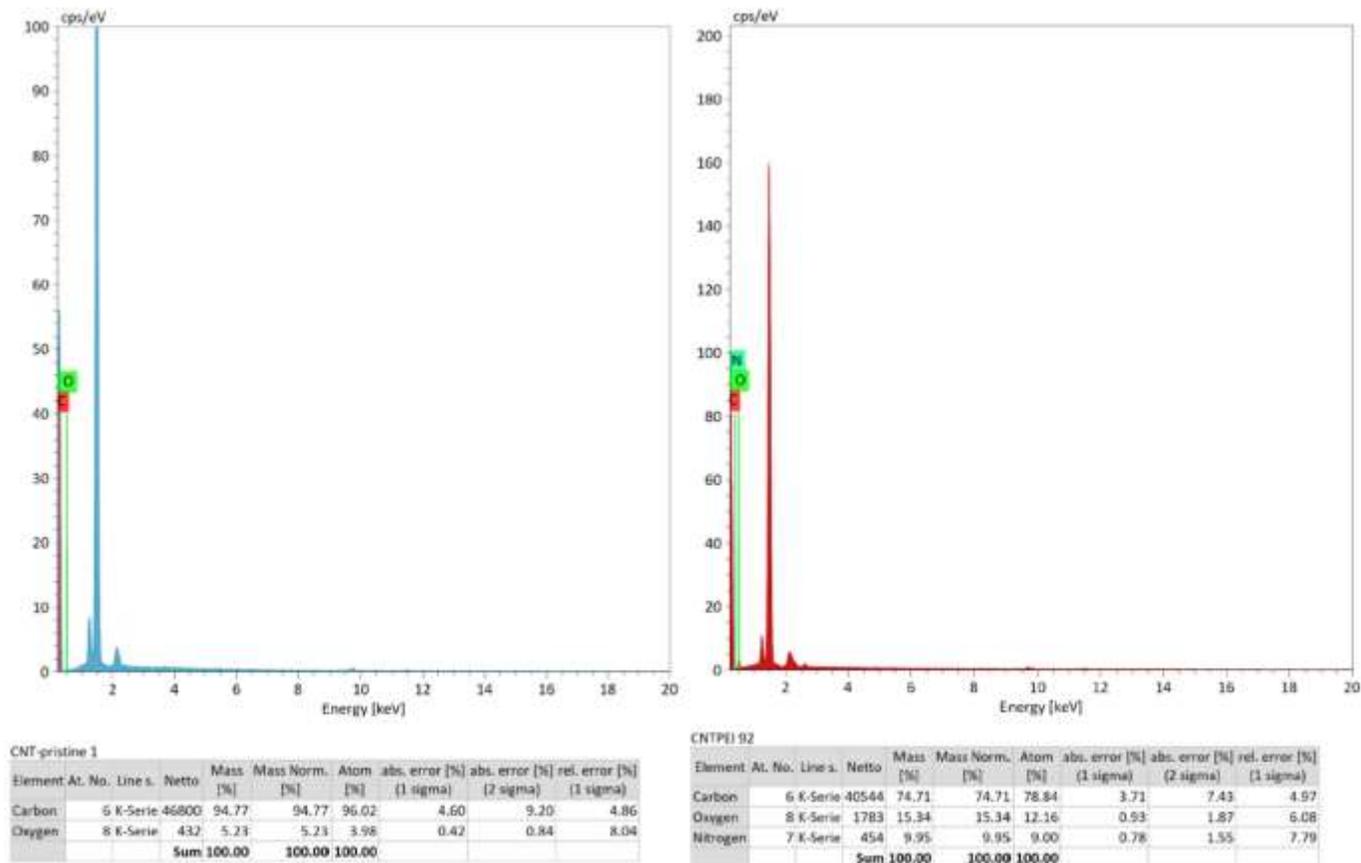


Fig. 7. Caracterización de los CNTs por análisis EDX. A) cCNTs y B) OxCNTs-PEI.

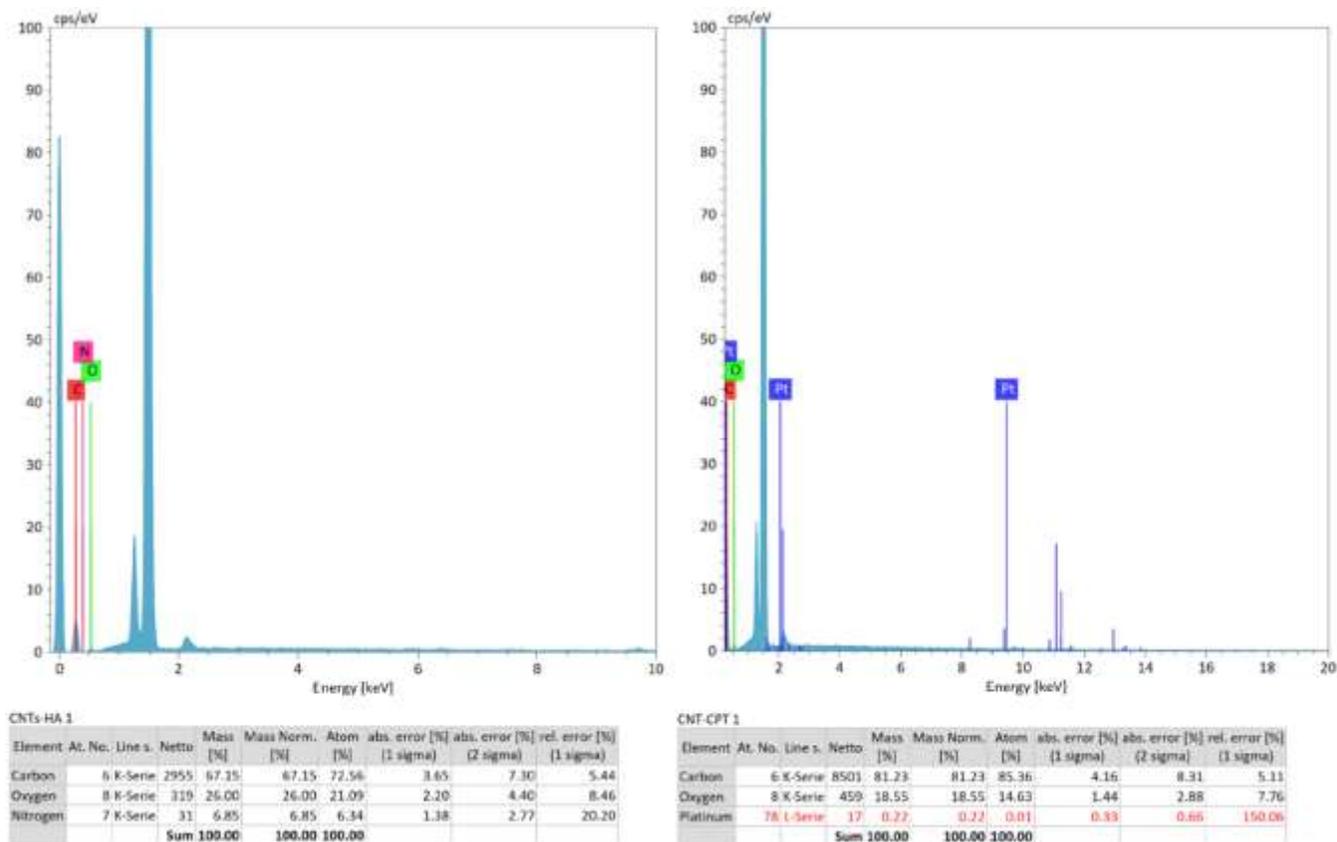


Fig. 8. Caracterización de los CNTs por análisis EDX. A) OxCNTs-HA y B) OxCNTs-HA-CPT.

6.1.3 Evaluación de la composición química de los CNTs mediante Espectroscopia FTIR y Espectroscopía de Raman

Para demostrar los componentes orgánicos generados durante los procesos de oxidación y funcionalización en nuestros CNTs se realizaron dos técnicas: la espectroscopía de Raman y Espectroscopía FTIR para complementar los resultados obtenidos con ambas técnicas.

El espectro Raman se muestra en la Fig. 9, observamos la presencia de dos picos: el pico G (grafito) presente en la región de 1580 cm^{-1} , el cual podemos observar que debido al proceso de oxidación ocurre una disminución en su intensidad y, por otra parte, el pico D (desorden)

en la región de 1350 cm^{-1} , que durante el proceso de oxidación observamos un aumento en la intensidad causada por la formación de grupos funcionales. Se obtuvo también la relación I_D/I_G donde después del proceso de oxidación hubo un aumento considerable de 0.20 indicando que existe una correlación positiva al proceso de desorden causado por la adición de grupos funcionales.

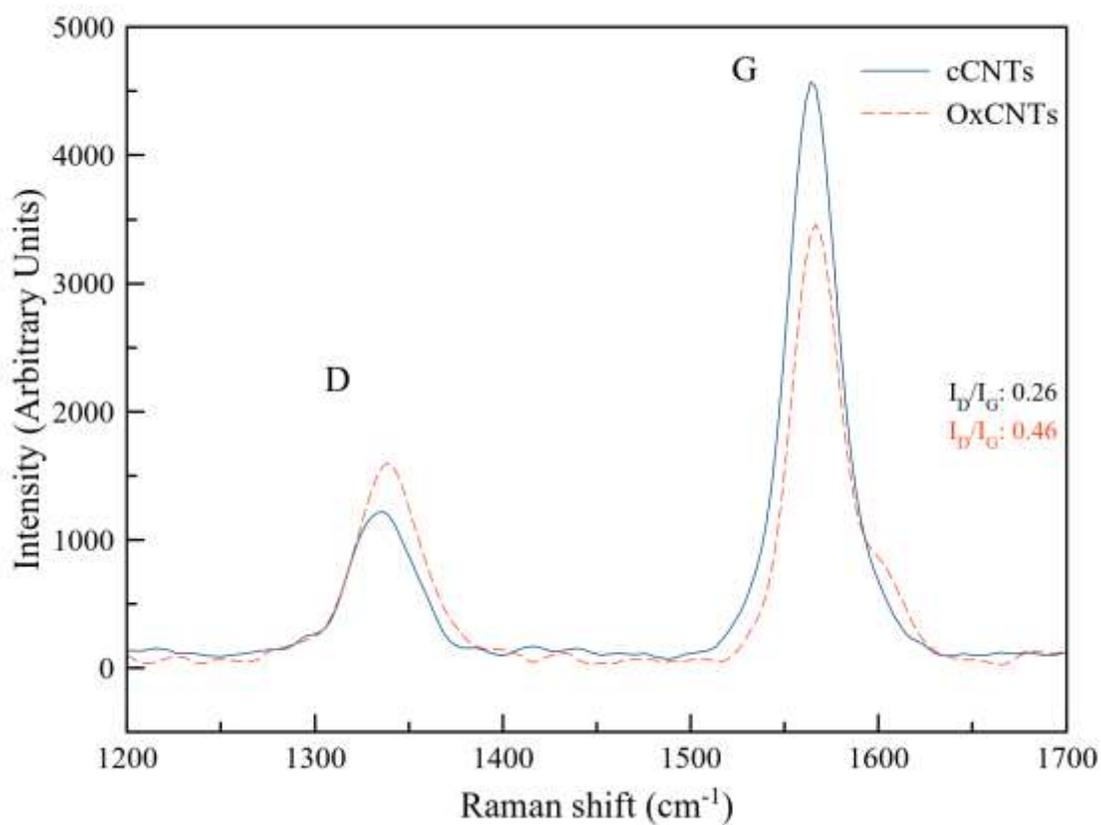


Fig. 9. Caracterización de los CNTs mediante Espectroscopía de Raman. Comparación de los cCNTs (Línea continua azul) frente a los OxCNTs (Línea discontinua roja).

En la Fig. 10A se observan los espectros de infrarrojos de los cCNTs y de los OxCNTs, donde en estos últimos se encontró la presencia de una banda amplia en la región cercana a los 3000

cm^{-1} que corresponde al grupo hidroxilo, y otra banda prominente en la región de 1700 cm^{-1} perteneciente al enlace carbonilo presente en el grupo carboxilo de estos grupos funcionales derivados por el proceso de oxidación en las capas superficiales de los CNTs. Por otro lado, en la Fig. 10B observamos la comparación de los espectros infrarrojos de los cCNTs, OxCNTs-PEI y OxCNTs-HA. En los OxCNTs-PEI se observan diferentes picos que corresponden a los grupos funcionales y moléculas orgánicas acopladas durante el proceso de funcionalización, y los OxCNTs-HA con la línea punteada verde. Observamos una banda amplia solo presente en la región de 1580 cm^{-1} , que corresponde al grupo carbonilo de la amida I que forma el enlace entre la PEI con el HA, demostrado la correcta incorporación de HA en la superficie de nuestro nanovector.

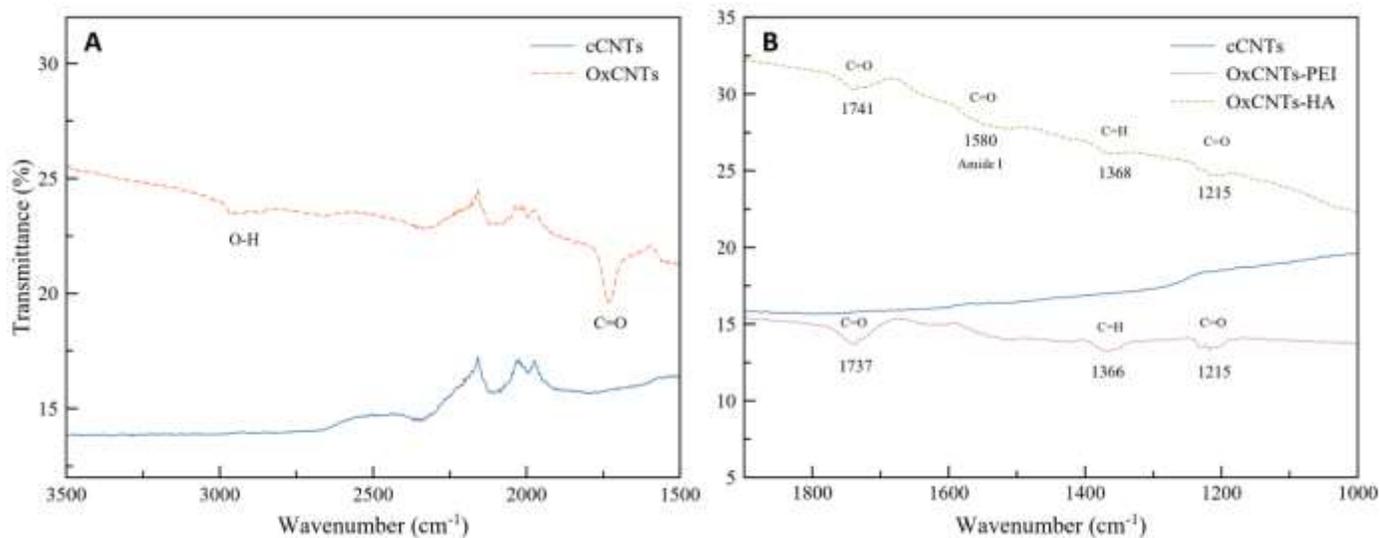


Fig. 10. Caracterización de los CNTs mediante Espectroscopía FTIR. A) Comparación de los cCNTs (línea continua azul) frente a los OxCNTs (línea discontinua roja). B) Comparación de los cCNTs (línea continua azul) frente a los OxCNTs-PEI (Línea discontinua vino) y OxCNTs-HA (línea discontinua verde).

6.2 Evaluación *in vitro* de la especificidad antitumoral de los OxCNTs-HA-CPT

6.2.1 Análisis del efecto citotóxico de los CNTs contra las células tumorales y no tumorales mediante el ensayo de MTT

Con el fin de determinar el efecto citotóxico de los diferentes CNTs en células tumorales y no tumorales para demostrar la especificidad de los OxCNTs-HA-CPT se obtuvo el porcentaje de viabilidad relativa a través de la actividad mitocondrial con el ensayo de MTT. Primero analizamos imágenes de campo claro obtenidas con el microscopio invertido, donde observamos en las Figs. 11 a 14 las imágenes representativas de las tres líneas celulares con las concentraciones de 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a 24 h de exposición a las diferentes construcciones.

En la Fig. 11 se observa que el tratamiento con los cCNTs muestra una notoria disminución de la confluencia celular en la línea no tumoral HEK293, de manera muy similar a lo observado en el tratamiento con CPT, debido a que las células no tumorales también son afectadas por este. Por otra parte, en las líneas tumorales HeLa y MDA-MB-231 observamos que muestran una resistencia a los tratamientos con cCNTs y CPT al mostrar una mayor confluencia celular. Al analizar el efecto que tienen los OxCNTs-HA-CPT observamos que la línea HEK293 presenta una mayor confluencia celular por lo cual podemos determinar que no son afectadas a diferencia de las células tumorales en las que se observa una disminución de la confluencia, lo que nos indica del efecto citotóxico selectivo de los OxCNTs-HA-CPT frente a las líneas celulares HeLa y MDA-MB-231. Este mismo comportamiento se observó en las Figs. 12, 13 y 14 de manera dosis-dependiente.

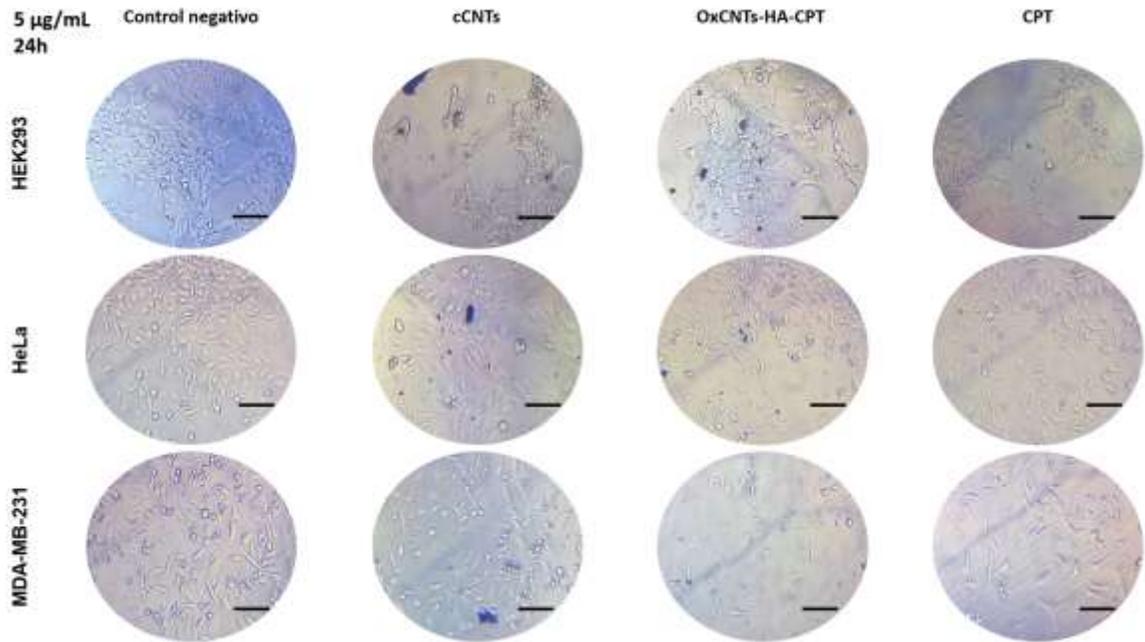


Fig. 11. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 50 μm .

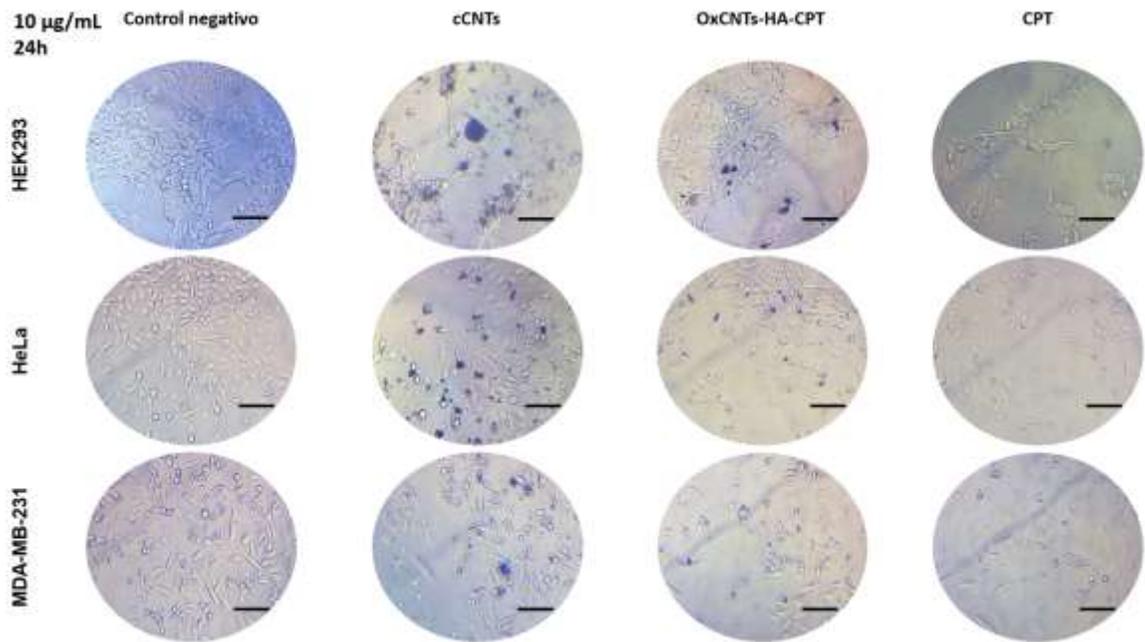


Fig. 12. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 50 μm .

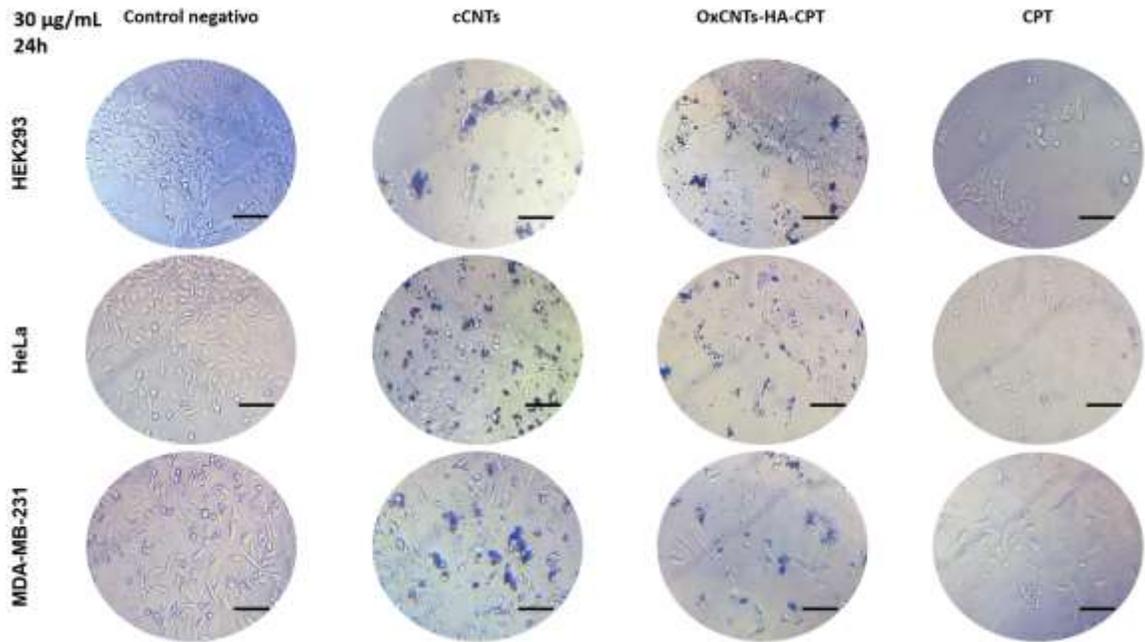


Fig. 13. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 50 μm .

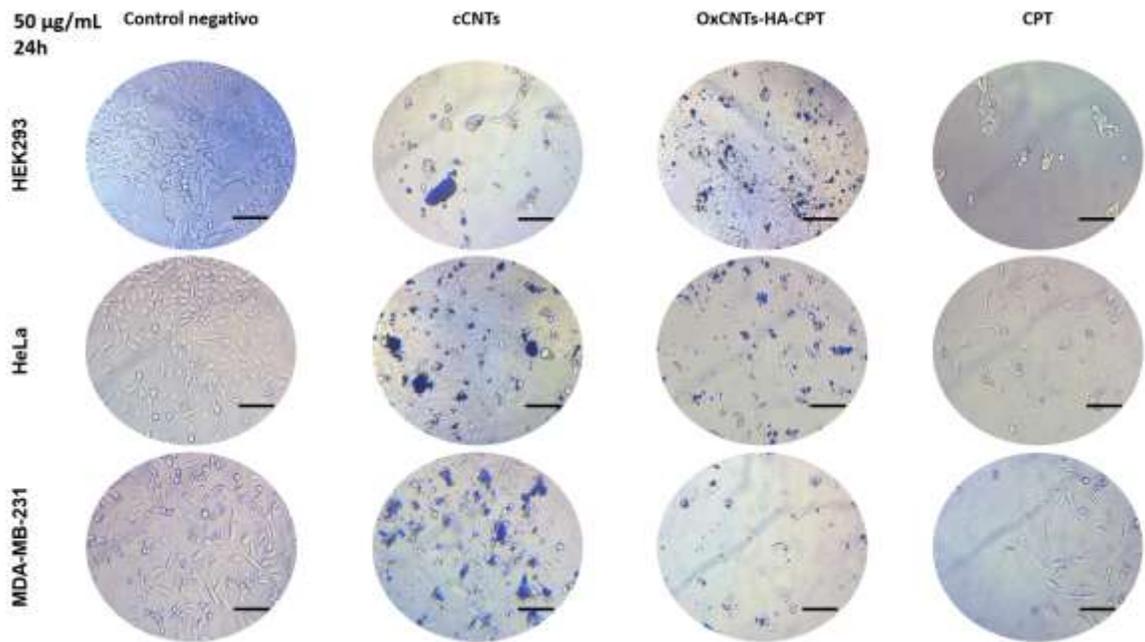


Fig. 14. Imágenes de campo claro tomadas a 10x a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 50 μm .

Con el fin de cuantificar el porcentaje de viabilidad relativa del ensayo de MTT se realizaron gráficas mostradas en la Fig. 15. El tratamiento con los cCNTs (azul) muestra una notoria disminución de la viabilidad relativa en células no tumorales HEK293 a las 24h en todas las concentraciones de manera dosis dependiente. Por el contrario, las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 muestran una menor afectación con el tratamiento al mostrar una viabilidad mayor en todas las concentraciones.

En el tratamiento con el CPT (naranja) se muestra el mismo comportamiento que con el tratamiento de los cCNTs: las células no tumorales HEK293 muestran una mayor afectación para este fármaco, mientras que las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 muestran una resistencia al CPT al observarse una menor disminución de la confluencia celular.

El tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT (morado) muestra un efecto citotóxico menor en las células no tumorales HEK293, este dato refleja la seguridad del tratamiento con el nanovector, a diferencia del comportamiento observado en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231 en el que muestra un efecto citotóxico mayor en comparación al tratamiento con el CPT, lo que nos indica un efecto selectivo del tratamiento contra las células tumorales.

En este contexto, también se observó que los CNTs funcionalizados muestran un menor efecto citotóxico en las células no tumorales HEK293, ya que todos los nanovectores funcionalizados mostraron un efecto citotóxico menor en comparación a los cCNTs. Por el contrario, en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231, el efecto de funcionalización mostró un efecto citotóxico mayor debido a la adición de grupos funcionales y moléculas orgánicas en su superficie.

Estos comportamientos descritos fueron muchos más evidentes en los tratamientos a las 24 h, mostrando diferencias significativas, y aunque el patrón parece mantenerse también a en los tratamientos a las 48 h, sin embargo, no es tan notorio como el observado a las 24 h.

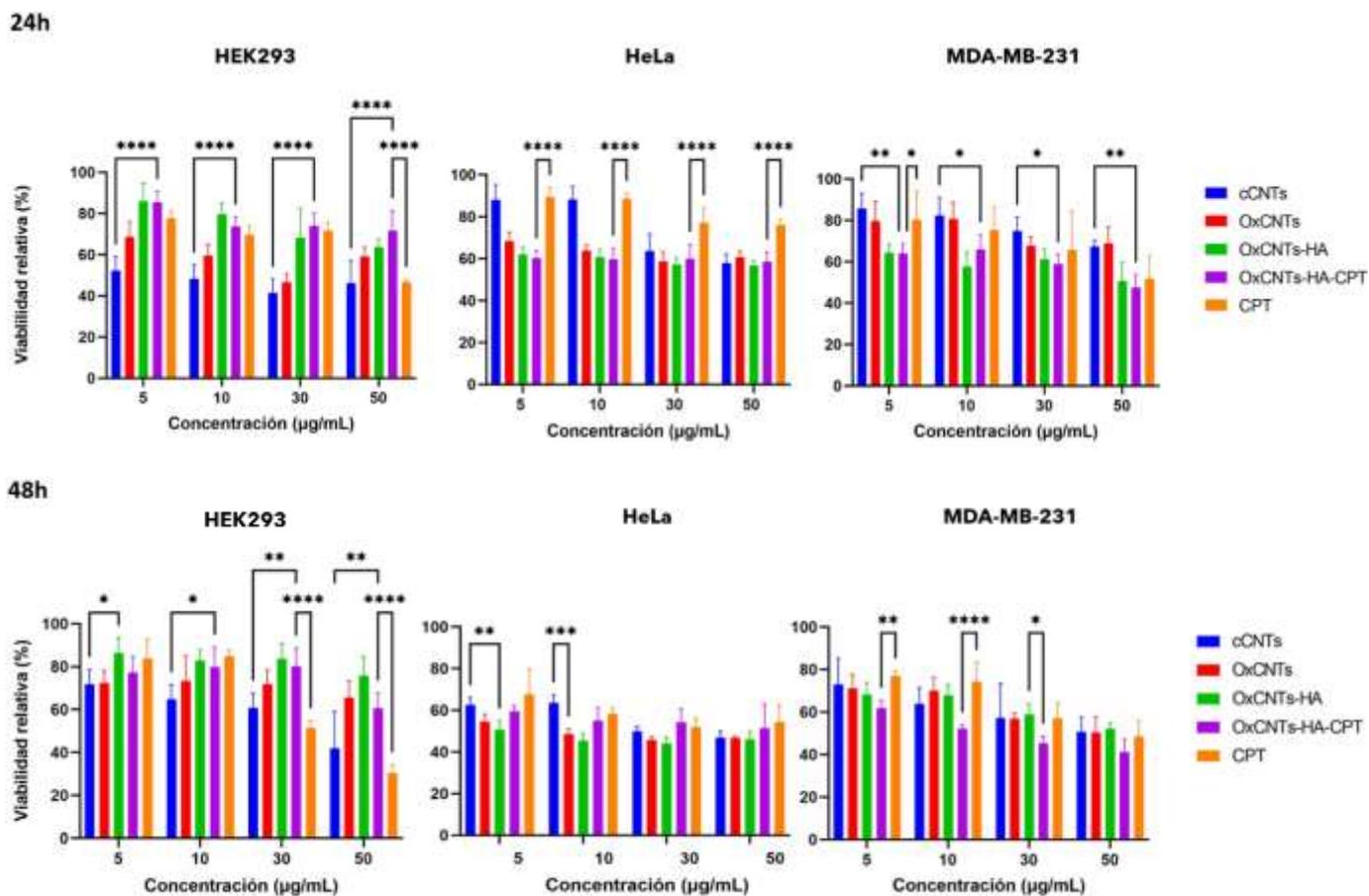


Fig. 15. Viabilidad relativa obtenida por el ensayo MTT. Gráficas de la viabilidad relativa obtenidas por el ensayo de MTT de las tres líneas celulares a las concentraciones de 5, 10, 30 y 50 µg /mL a las 24 y 48 h. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** $P < 0,005$.

6.2.2 Análisis del efecto citotóxico de los CNTs vs las células tumorales y no tumorales mediante la tinción nuclear con DAPI

Para comparar los resultados obtenidos con el ensayo de MTT se realizó la tinción nuclear con DAPI, correlacionando el porcentaje de células adheridas a la placa con la viabilidad celular. En las Figs. 16 a 19 se muestran las imágenes representativas tomadas a 10x a las concentraciones de 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a 24 h de las diferentes construcciones en las tres líneas celulares.

En la Fig. 16 se observa como el tratamiento con los cCNTs muestra una notoria disminución de la adherencia celular en las células no tumorales HEK293, mismo comportamiento observado en el tratamiento con CPT; a diferencia de lo observado en el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT en el que las células no tumorales muestran una menor disminución de la adherencia celular en comparación a los tratamientos con cCNTs y CPT.

En las células tumorales HeLa y MDA-MB-231, se puede distinguir un menor daño celular a los tratamientos con los cCNTs y el CPT al mostrar una menor disminución de la adherencia celular. Por otra parte, el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT muestra una marcada disminución de la adherencia celular en las células tumorales, mostrando nuevamente este efecto citotóxico selectivo frente a estas células.

Este mismo comportamiento se observó en las Figs. 17, 18 y 19 bajo un efecto dosis-dependiente, mostrando resultados similares a las observadas en las imágenes de campo claro.

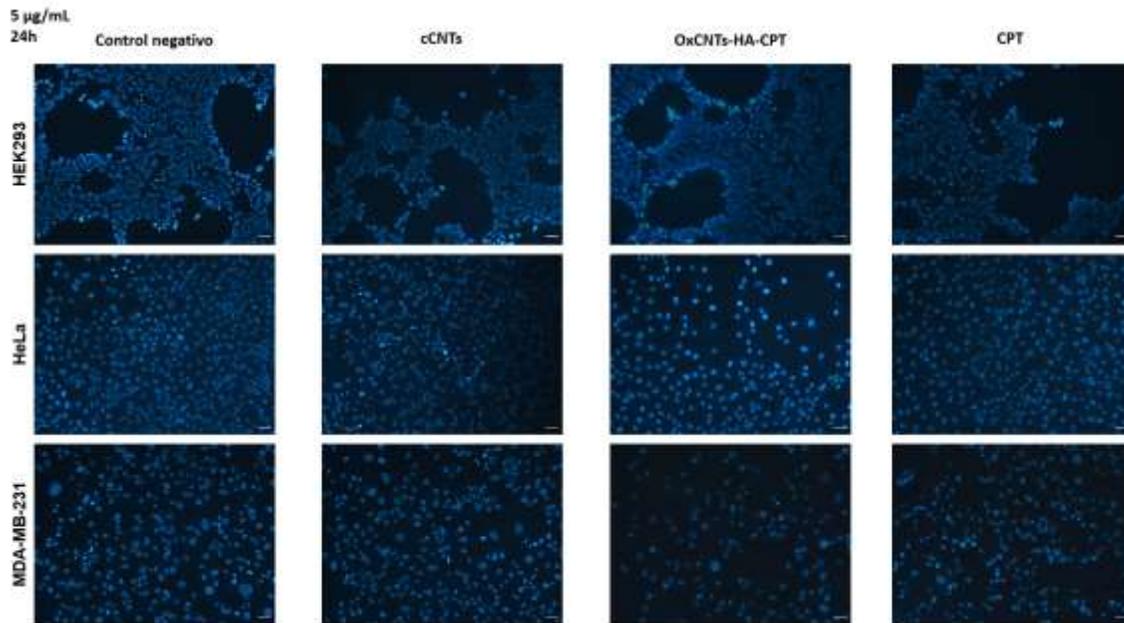


Fig. 16. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 20 μm .

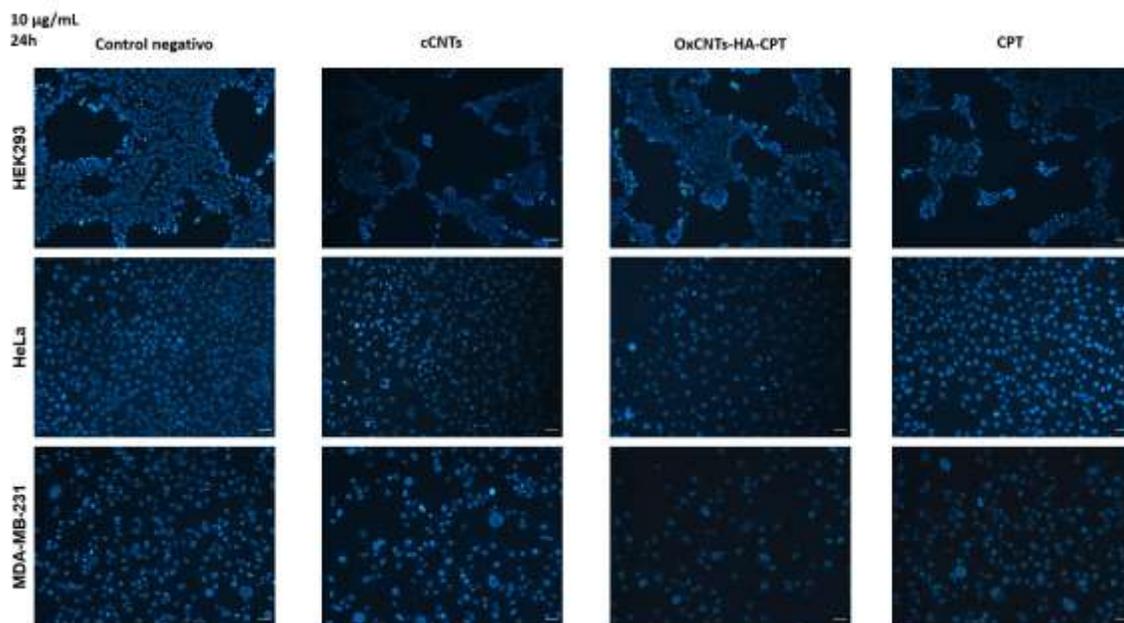


Fig. 17. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 20 μm .

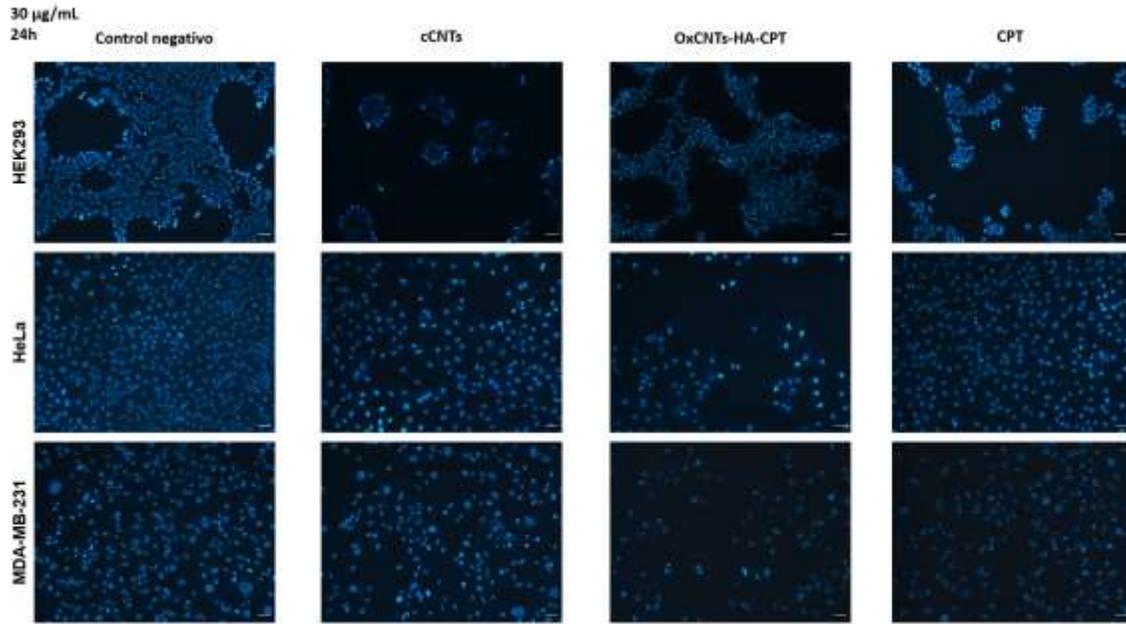


Fig. 18. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 30 µg/mL a las 24 h. Barra de escala: 20 µm.

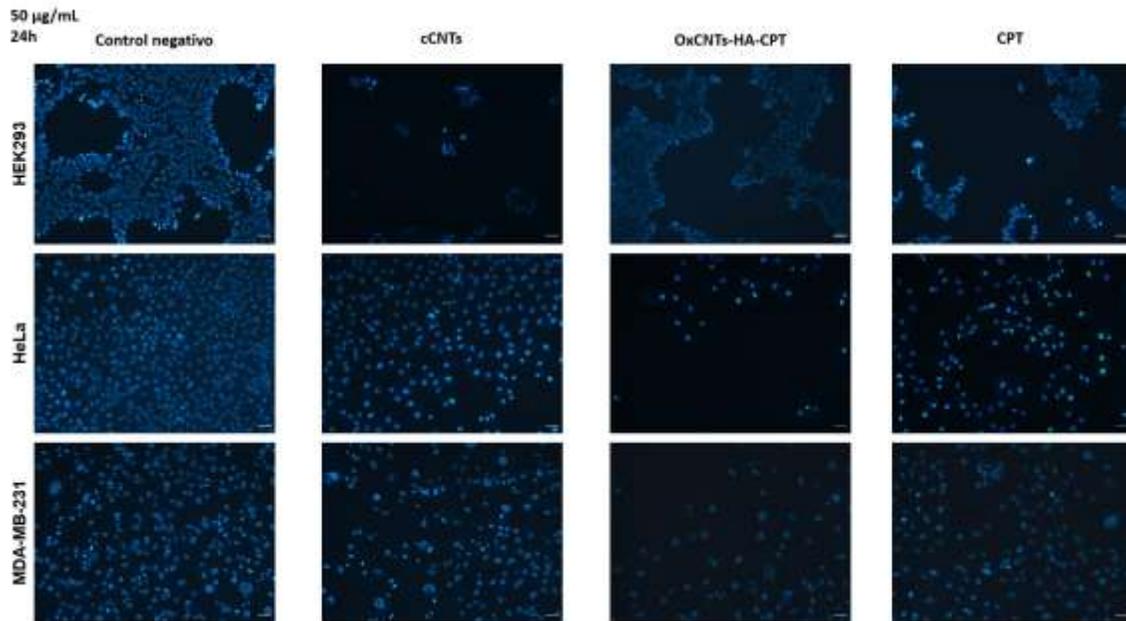


Fig. 19. Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia a 10x a la concentración de 50 µg/mL a las 24 h. Barra de escala: 20 µm.

Para cuantificar el porcentaje de viabilidad se realizó un análisis morfométrico con el software ImageJ y las gráficas obtenidas se muestran en la Fig. 20. Se muestran resultados muy similares a los obtenidos en las gráficas de los ensayos de MTT: el tratamiento con los cCNTs (azul) y el CPT (naranja) muestran un efecto citotóxico mayor en comparación a la terapia con los OxCNTs-HA-CPT (morado) en las células no tumorales HEK293, lo que demuestra la seguridad de la terapia con nuestro nanovector que tiene un efecto citotóxico menor en comparación a todas las construcciones de CNTs y el CPT.

Al observar el efecto de los tratamientos en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231, podemos notar cómo estas muestran menor afectación con los tratamientos de cCNTs y CPT al mostrar un efecto citotóxico menor en comparación a las células no tumorales. Por lo contrario, el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT muestra un notable efecto citotóxico mayor a diferencia de las otras construcciones de CNTs y el CPT, mostrando nuevamente este efecto selectivo contra las células tumorales.

También podemos observar que el proceso de funcionalización induce una disminución del efecto citotóxico en las células no tumorales HEK293, en las que se observa un aumento gradual de la viabilidad celular a medida que los CNTs adquieren un mayor grado de funcionalización, este efecto fue contrario al que se observa en las células tumorales HeLa y MDA-MB-2341, en las que la funcionalización de nuestros nanovectores provoca un efecto citotóxico mayor en comparación a los cCNTs.

Estos comportamientos descritos se mantienen en todas las concentraciones a las 24 y 48 h bajo un efecto dosis-dependiente en las tres líneas celulares, reafirmando nuestros resultados obtenidos con el ensayo de MTT.

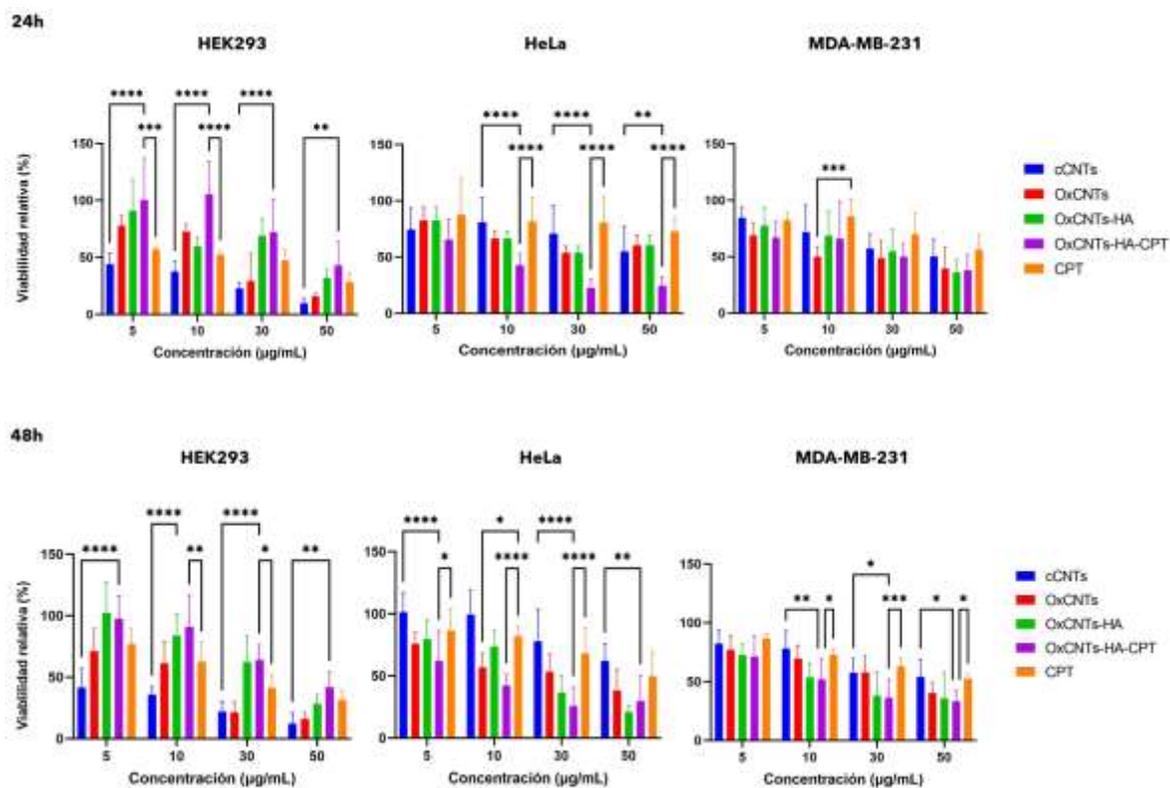


Fig. 20. Viabilidad relativa obtenida por la tinción nuclear DAPI. Gráficas de la viabilidad relativa obtenidas por la tinción nuclear con DAPI de las tres líneas celulares a las concentraciones de 5, 10, 30 y 50 µg/mL a las 24 y 48 h, 8 campos de imágenes a 10x. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** $P < 0,005$.

6.3 Evaluación de la inducción de apoptosis por la terapia con los OxCNTs-HA-CPT

6.3.1 Análisis de los cambios morfológicos de muerte celular en la terapia con los CNTs

Para encontrar cambios característicos de muerte celular que suceden en el tratamiento con los CNTs se realizaron cortes semifinos. En la Fig. 21 se observan las imágenes obtenidas en el microscopio de campo claro obtenidas con el objetivo de alto aumento (100x), en las tres líneas celulares y con las diferentes construcciones de CNTs a la concentración de 30 µg/mL.

En las imágenes obtenidas se observó que en el tratamiento con los cCNTs se perciben cambios característicos de muerte celular como la migración marginal de la cromatina hacia la membrana nuclear, esto se observa claramente en la línea no tumoral HEK293 y en la línea tumoral HeLa. En la línea tumoral MDA-MB231 podemos observar la condensación de la cromatina o picnosis en el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT.

Finalmente, en el tratamiento con CPT principalmente en la línea no tumoral HEK293 se observa cómo la gran mayoría de las células presentan una amplia vacuolización del citoplasma, mismo cambio que puede observarse en la línea tumoral MDA-MB-231 aunque con mucha menor frecuencia.

Estos cambios morfológicos celulares se derivan de la activación de la muerte celular regulada que sucede después de la incubación de las células con los diferentes tratamientos.

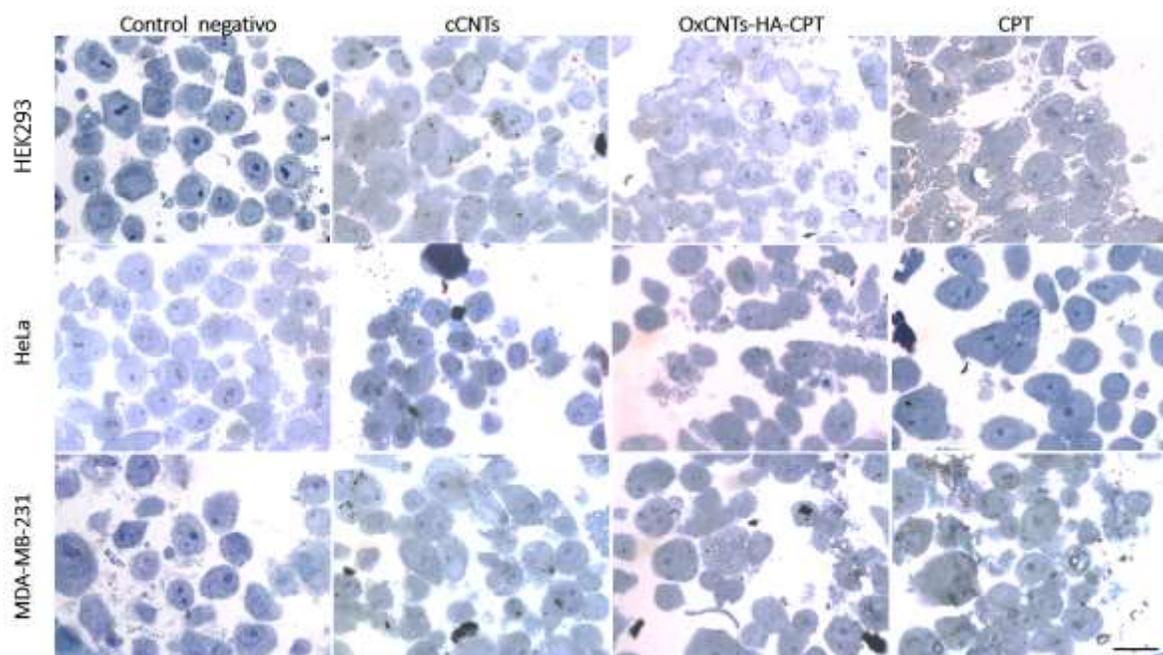


Fig. 21. Cortes semifinos tomados a 100x a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h. Barra de escala: 50 μm .

Para cuantificar el porcentaje de células con cambios característicos de muerte celular se realizó un conteo en 8 campos con objetivo de alto aumento (100x), y se obtuvieron las gráficas mostradas en la Fig. 22. Podemos observar cómo en la línea no tumoral HEK293 sometida a los tratamientos con los cCNTs (azul) y el CPT (naranja) muestran un mayor porcentaje de células con cambios morfológicos de muerte celular, a diferencia de los tratamientos con los OxCNTs (rojo) y OxCNTs-HA (verde) que mostraron una reducción en la aparición de estos cambios. Además de que los OxCNTs-HA-CPT (morado) muestran el menor porcentaje de cambios.

Por el contrario, las líneas tumorales HeLa y MDA-MB-231 muestran un patrón opuesto al tratamiento en la línea no tumoral: en ambas líneas se observa cómo la terapia con los OxCNTs-HA-CPT muestra el mayor porcentaje de células con cambios morfológicos de muerte celular, incluso mayor que el CPT, aunque no de manera significativa.

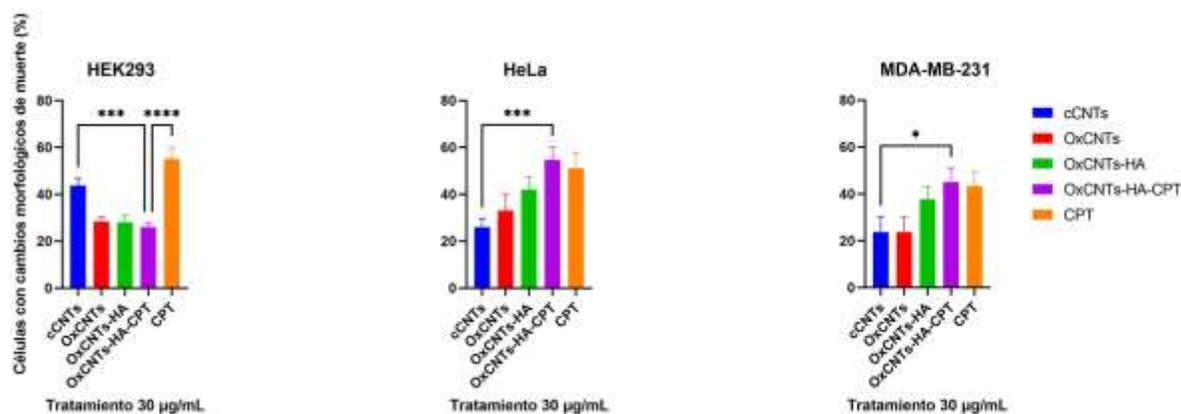


Fig. 22. Porcentaje de células con cambios morfológicos de muerte celular. Gráficas obtenidas por el conteo de las células con cambios morfológicos de muerte en las tres líneas celulares a la concentración de 30 µg /mL a las 24 h, 8 campos de imágenes a 100x. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ****P < 0,005.

6.3.2 Análisis del efecto apoptótico en la terapia con los CNTs mediante la detección de Caspasa-3 activa

Para determinar la presencia del proceso de la apoptosis en el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT se realizó un ensayo de inmunofluorescencia mediante la detección de la proteína Caspasa-3 activa, un mediador clave en la vía de la apoptosis, este se identificó con un anticuerpo primario específico caspase-3 p11, Santa Cruz Biotechnology® y posteriormente se unió el anticuerpo secundario con Alexa Fluor™ Plus 555 para visualizar la señal en color rojo, además de realizar una contratinción nuclear con DAPI.

En la Fig. 23 se muestra la línea celular no tumoral HEK293, en la que se observa primeramente el control negativo ausencia de la señal, posteriormente, en el tratamiento con los cCNTs se observa una ligera señal citoplasmática de color rojo y cómo dicha señal aumenta con el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT, además en el tratamiento con CPT se observa una intensa señal citoplasmática debida al efecto apoptótico del fármaco quimioterapéutico.

De igual forma, en la Fig. 24 se muestra la línea celular tumoral HeLa, en la que nuevamente observamos la ausencia de señal en el control negativo, una débil señal en el tratamiento con los cCNTs y una intensa señal citoplasmática en el tratamiento con CPT; sin embargo, el tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT muestra una fuerte señal similar a la del CPT, contrario de lo observado en la línea celular no tumoral.

En la Fig. 25 se muestra la línea tumoral MDA-MB-231 que muestra el mismo comportamiento descrito en la línea celular HeLa.

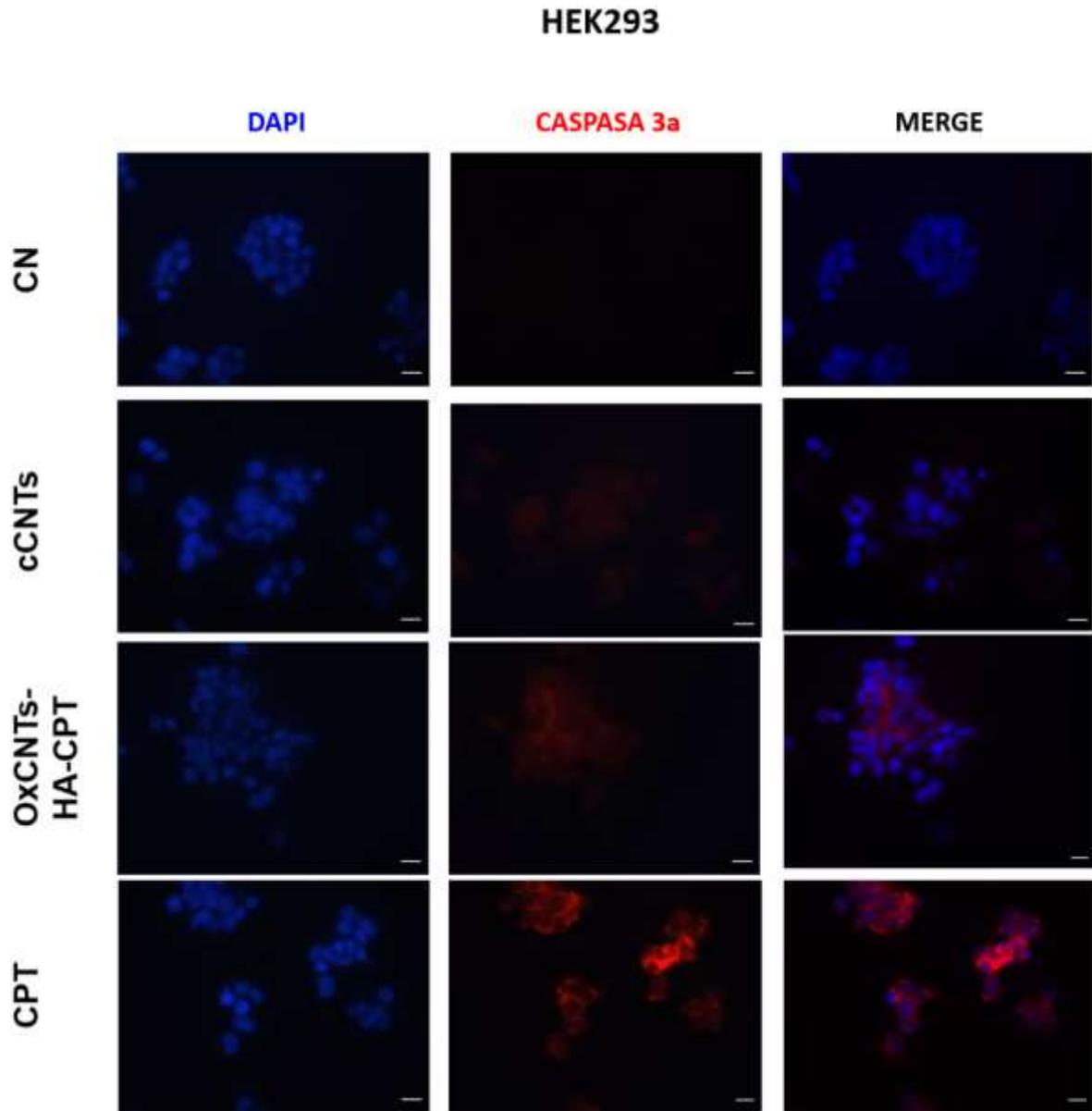


Fig. 23. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular no tumoral HEK293 a la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 μm .

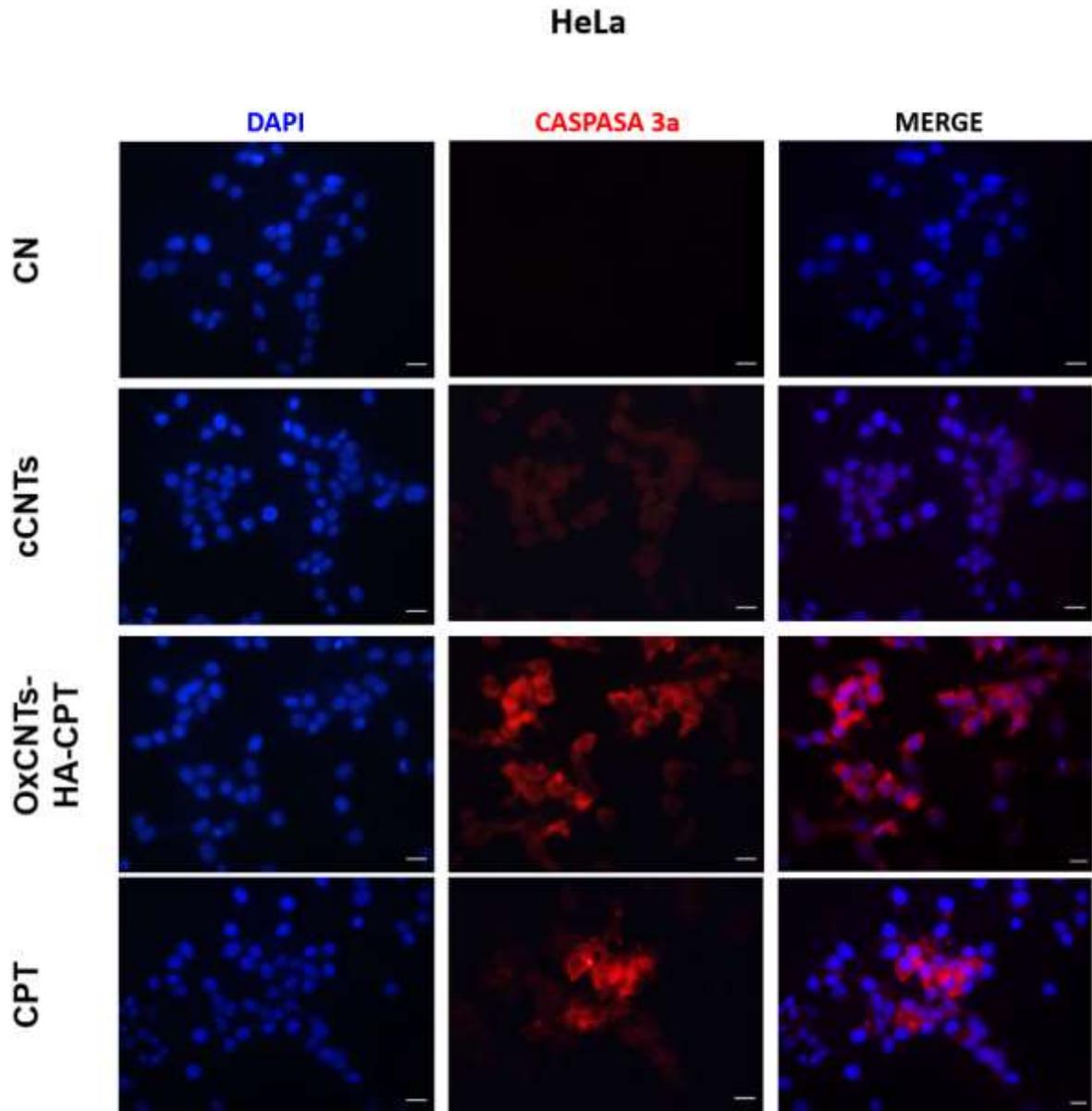


Fig. 24. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular tumoral HeLa a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 μm .

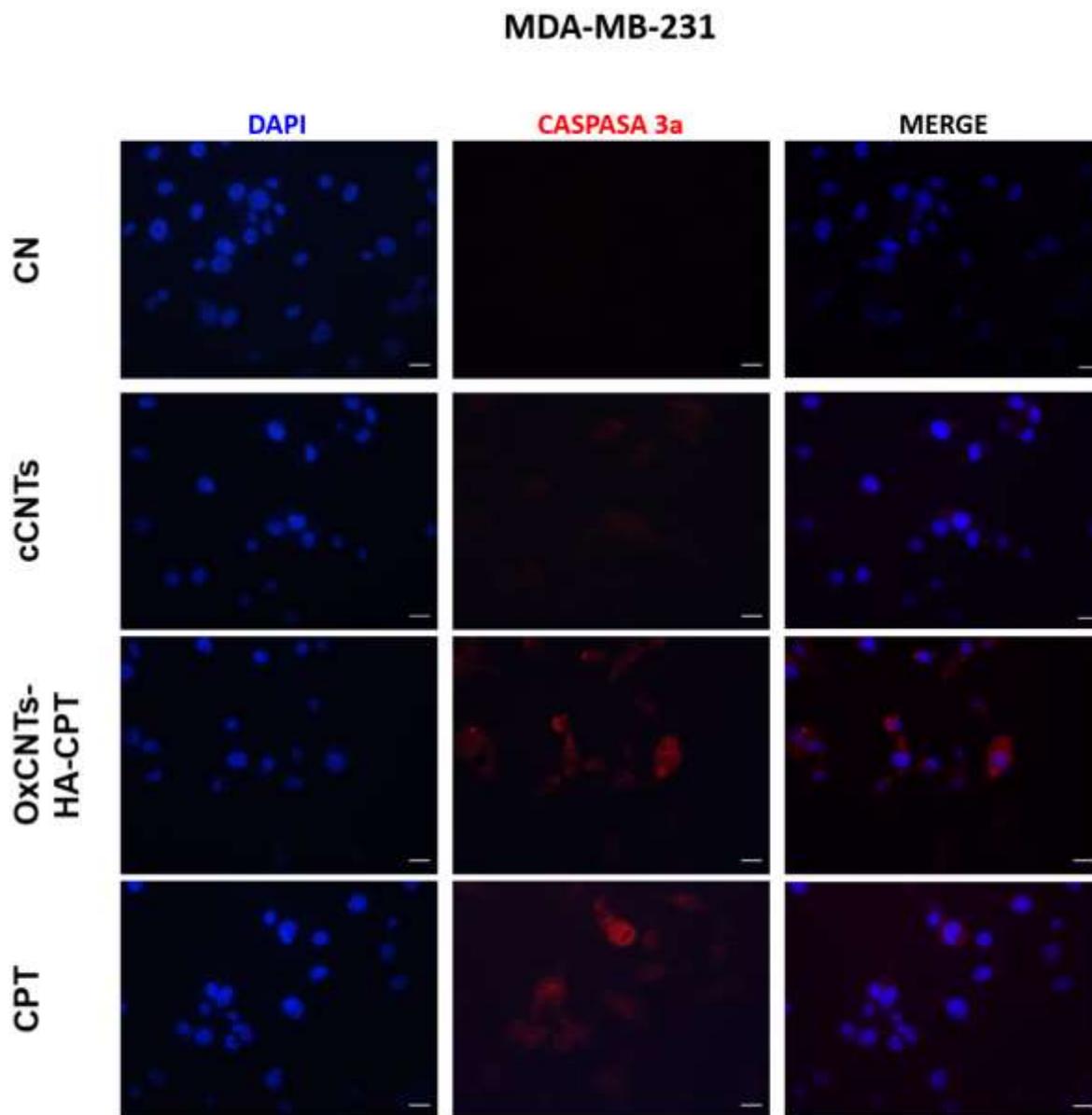


Fig. 25. Inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a. Línea celular tumoral MDA-MB-231 a la concentración de 30 µg/mL a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 µm.

Posteriormente, se realizó una cuantificación del porcentaje de área para Caspasa-3 activa por medio de software ImageJ y las gráficas obtenidas se muestran en la Fig. 26, la cual muestra como la terapia con CPT (naranja) muestra un mayor porcentaje de área de Caspasa-3a debido al efecto apoptótico del fármaco en las tres líneas celulares.

Así mismo, la terapia con los OxCNTs-HA-CPT (morado) muestra un efecto muy similar al del CPT, mostrando incluso un mayor porcentaje de área de Caspasa-3a en las líneas tumorales HeLa y MDA-MB-231.

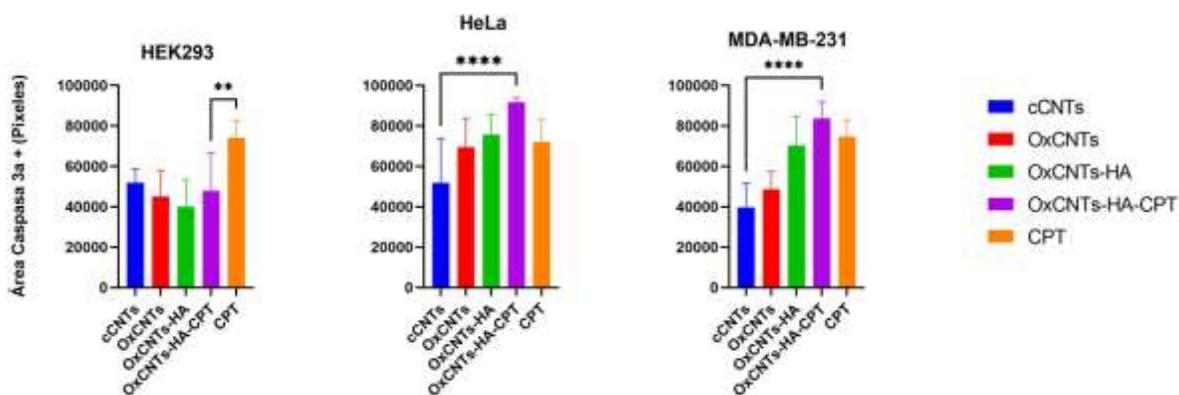


Fig. 26. Gráficas obtenidas de la cuantificación de Caspasa-3a. Cuantificación del área de Caspasa-3a en las 3 líneas celulares a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, 8 campos de imágenes a 40x. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** $P < 0,005$.

6.3.3 Análisis del efecto apoptótico en la terapia con los CNTs mediante la detección de fragmentación del ADN

Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo de inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a se utilizó el kit TUNEL para detectar fragmentación del ADN, en el que podemos ver las células positivas para este ensayo de color verde brillante, además de contrateñir con la tinción nuclear con DAPI en azul.

En la Fig. 27, se muestra la línea celular no tumoral HEK293 tratada a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h: en el control negativo observamos una ausencia de células TUNEL positivas. Por otra parte, en los tratamientos con cCNTs y OxCNTs-HA-CPT se muestra un pequeño número de células TUNEL positivas, a diferencia de lo observado en el tratamiento con CPT en la que se observa un gran número de células TUNEL positivas.

En la Fig. 28 se muestra la línea tumoral HeLa tratada a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h: en el control negativo nuevamente observamos una ausencia de células TUNEL positivas, a diferencia de lo observado en la línea no tumoral el tratamiento con cCNTs muestra muy pocas células TUNEL positivas a diferencia del tratamiento con los OxCNTs-HA-CPT que muestra un gran número de células TUNEL positivas, efecto muy similar al observado en el tratamiento con el CPT.

En la Fig. 29 se muestra la línea tumoral MDA-MB-231 tratada a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, en la que observamos el mismo comportamiento descrito para las células HeLa.

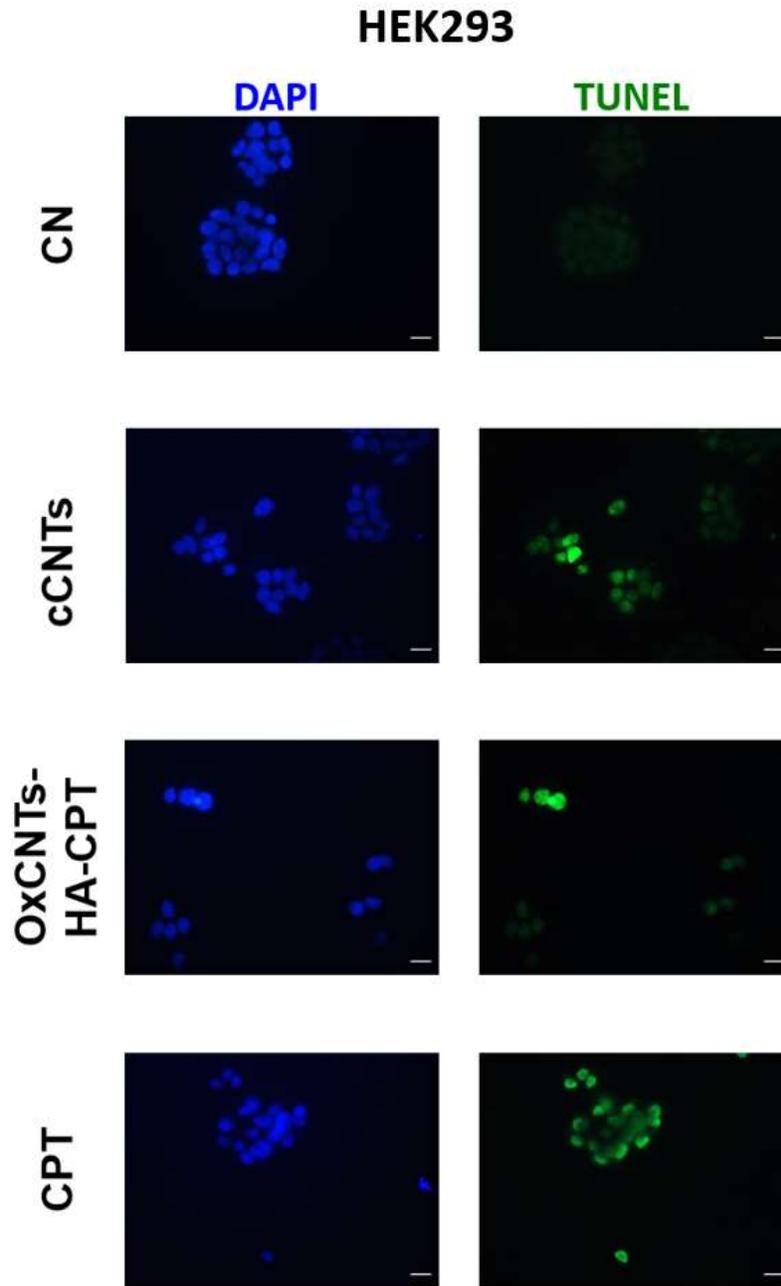


Fig. 27. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular no tumoral HEK293 a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 μm .

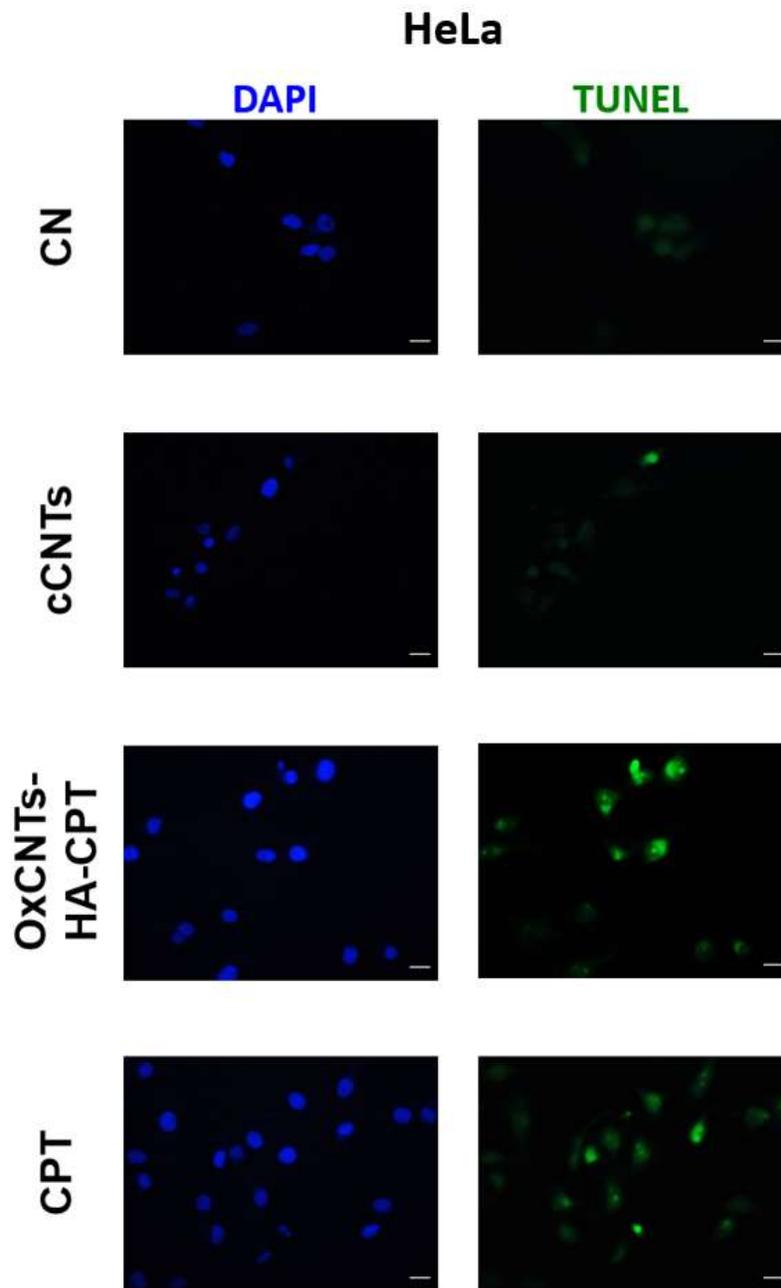


Fig. 28. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular tumoral HeLa a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 μm .

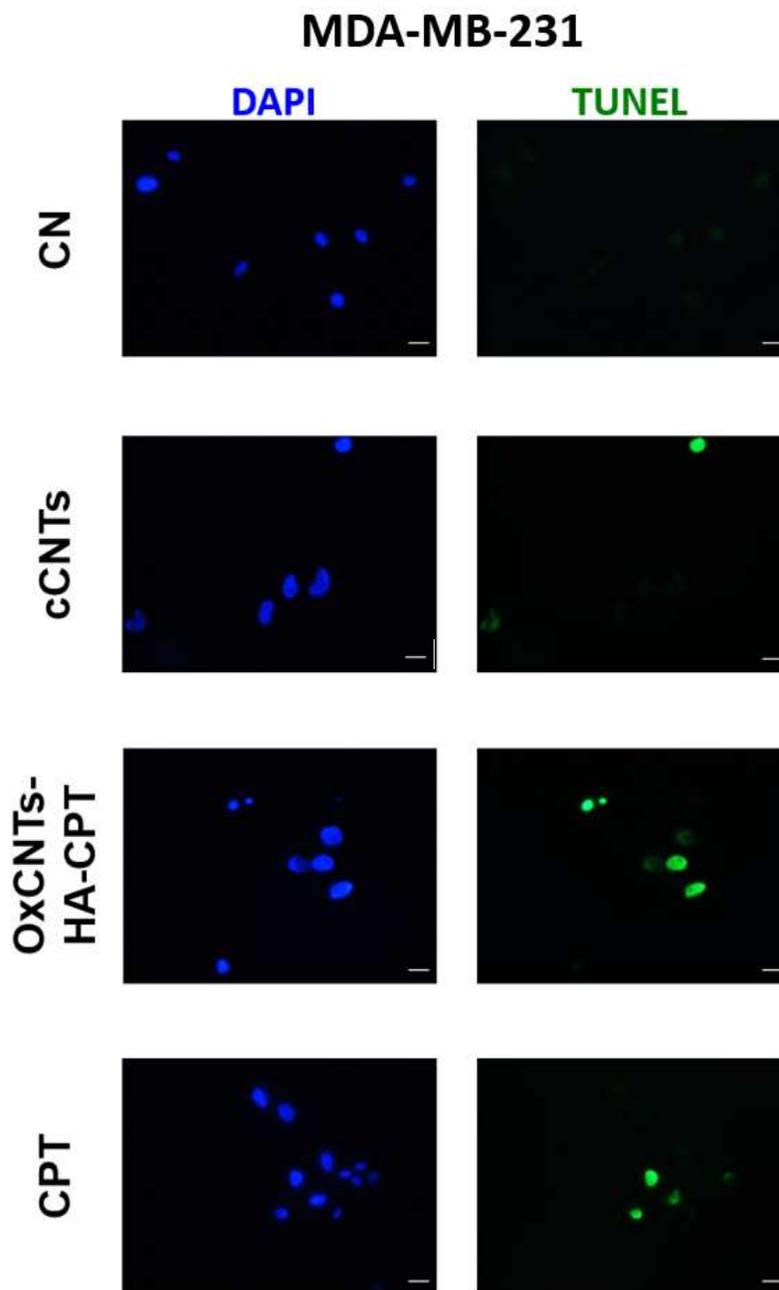


Fig. 29. Inmunofluorescencia del ensayo TUNEL. Línea celular tumoral MDA-MB-231 a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, imágenes tomadas a 40x, barra de escala: 50 μm .

Se realizó una cuantificación de las células TUNEL positivas para correlacionar lo observado en las imágenes del ensayo TUNEL. En la Fig. 30 se muestran las gráficas obtenidas de la cuantificación, en donde observamos que en las tres líneas celulares el tratamiento con CPT (naranja) muestra un mayor porcentaje de células TUNEL positivas, a diferencia de los cCNTs (azul), OxCNTs (rojo) y OxCNTs-HA (verde).

Al observar el comportamiento de los OxCNTs-HA-CPT (morado) este muestra un mayor porcentaje de células TUNEL positivas, en comparación con el CPT en las líneas tumorales HeLa y MDA-MB-231 que se correlaciona con lo observado en el ensayo de inmunofluorescencia anti-Caspasa 3a.

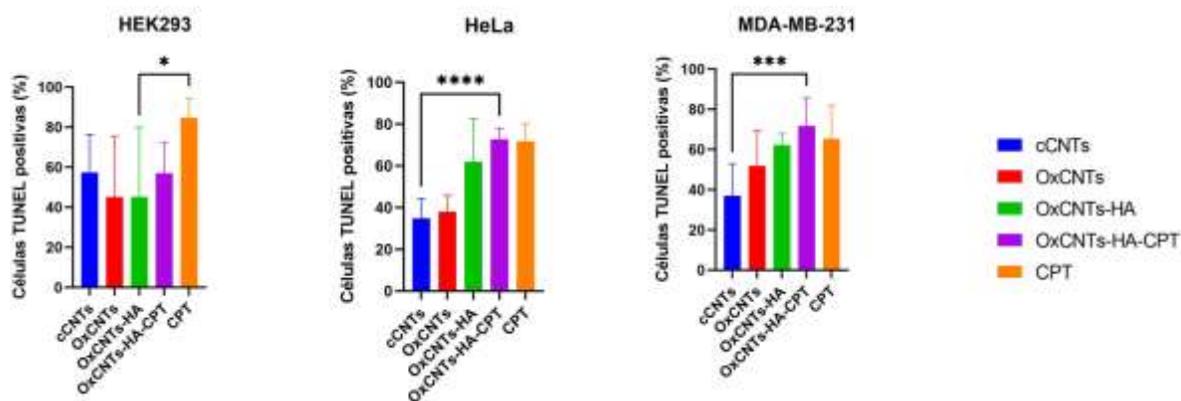


Fig. 30. Gráficas obtenidas de la cuantificación de células TUNEL positivas. Cuantificación de células TUNEL positivas en las 3 líneas celulares a la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, 8 campos de imágenes a 40x. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** $P < 0,005$.

7. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en el presente trabajo se pueden resumir en tres partes: primeramente, se realizó una amplia caracterización de las diferentes construcciones de CNTs utilizadas como tratamientos, posteriormente se emplearon análisis de viabilidad celular en células tumorales y no tumorales humanas para determinar la selectividad de los OxCNTs-HA-CPT, y finalmente se analizó si este efecto citotóxico era mediado por apoptosis para ampliar más el conocimiento que se tiene por parte de nuestro tratamiento.

Uno de los pasos más importantes e indispensables que se debe realizar al trabajar con NPs durante su síntesis es la caracterización fisicoquímica (Negri et al., 2020), debido a sus diferentes materiales de construcción, configuraciones espaciales y de grupos funcionales. Durante el proceso de funcionalización es necesario realizar una caracterización de las diferentes construcciones, ya que esto nos corrobora su correcta síntesis, además de que proporciona estrategias para mejorar la selectividad y la carga de fármaco de nuestras NPs (Yohan & Chithrani, 2014).

En las imágenes de SEM observamos cambios discretos en la morfología superficial de los CNTs anteriormente descritos en la literatura con diferentes protocolos de oxidación, como el utilizado por Wisdom et al. (2020) con ácido sulfúrico y ácido nítrico, que describen que los OxCNTs presentan un acortamiento en su longitud y una estructura superficial rugosa debido a la adición de grupos funcionales OH y COOH, a diferencia de los cCNTs (Wisdom et al., 2020). Además, observamos cómo los OxCNTs-HA y los OxCNTs-HA-CPT mostraron las mismas características que los OxCNTs, con un aumento en la estructura superficial rugosa debido a la incorporación de las moléculas orgánicas durante el proceso

de funcionalización, lo que correlaciona con lo descrito por Jun et al. (2019) incorporando diferentes moléculas orgánicas como el quitosano.

El análisis de EDX nos permite conocer la estructura elemental superficial de las diferentes construcciones de CNTs. Primeramente, los cCNTs mostraron que cerca del 95% de su masa corresponde al átomo Carbono (C) dado por la estructura grafénica, y casi un 5% al átomo Oxígeno (O) dada por los grupos COOH correspondiendo con las especificaciones del fabricante. Al comenzar el proceso de funcionalización e incorporar el PEI ocurre una disminución en el C, un aumento de casi 3 veces la presencia de O debido a la presencia de los grupos funcionales generados durante el proceso de oxidación y la aparición del átomo de Nitrógeno (N), este último presente en los grupos amina de PEI previamente descrito en la literatura (Zhuang et al., 2017).

Después de la incorporación del HA, en el análisis EDX se muestra un aumento en la cantidad de O con una disminución en la cantidad de N debido a la incorporación del HA a nuestro nanovector a través del PEI que, como ha sido descrito en diferentes estudios con nanomateriales de carbono, permite biodirigir estos nanovectores contra las células tumorales que sobreexpresan el receptor CD44 (Kearns et al., 2022). Finalmente, al observar los OxCNTs-HA-CPT se encontró la presencia del átomo de Platino (Pt), que está presente en la estructura de la molécula del CPT (Dilruba & Kalayda, 2016).

Para complementar los resultados obtenidos por SEM y análisis EDX, se realizaron métodos espectrométricos como la espectroscopia de Raman y FTIR, dos técnicas complementarias que permiten demostrar la presencia de grupos funcionales y moléculas orgánicas incorporadas durante el proceso de funcionalización (Tao, 2013). El espectro obtenido por espectroscopia de Raman nos permitió demostrar el aumento de defectos en la pared de los

CNTs, que se forman durante el proceso de oxidación al adicionarse los grupos OH y COOH y perder esta estructura hexagonal ordenada del grafeno. Se observó una disminución en el pico G de grafito y un aumento de pico D de desorden, además de obtener la relación I_D/I_G que nos permite cuantificar este grado de desorden obteniendo una clara diferencia, mismo comportamiento que ha sido descrito en la literatura por Dresselhaus en el 2010, lo que nos confirma el correcto proceso de oxidación de los CNTs (Dresselhaus et al., 2010).

Al analizar los espectros obtenidos por FTIR, los cCNTs sólo presentaban bandas de absorción característica del grafeno, a diferencia de lo observado en los OxCNTs. Corroboramos lo obtenido con espectroscopia de Raman en los OxCNTs que muestra una banda amplia en la región cercana a 3000 cm^{-1} que corresponde al grupo OH, y un pico en la región cercana a 1700 cm^{-1} que corresponde al enlace carbonilo presente en el grupo COOH, al igual que lo descrito por Țucureanu et al. (2016) en la que demostró características de espectroscopia FTIR en materiales de carbono (Țucureanu et al., 2016).

Para corroborar la incorporación de las moléculas orgánicas nuevamente realizamos espectroscopia FTIR. Al observar el espectro de los cCNTs, estos muestran nuevamente bandas de absorción característica del grafeno, y al compararlo con los de OxCNTs-PEI y OxCNTs-HA se observan diferentes picos, dentro de los cuales la banda amplia en la región de 1580 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo de la amida I formada por la unión del HA al agente acoplador PEI, estos resultados son similares a los descritos por Hussain en el 2016 que utilizó un protocolo muy similar para la conjugación del HA en los CNTs (Hussain et al., 2016).

Con todos los experimentos de caracterización descritos anteriormente, demostramos un buen proceso de oxidación que nos permitió el posterior acoplamiento de las moléculas

orgánicas, una correcta incorporación del PEI y HA durante el proceso de funcionalización que nos permite biodirigir nuestro nanovector, además de demostrar la presencia del CPT para aumentar el efecto citotóxico contra las células tumorales.

Uno de los aspectos más importantes al elegir un tratamiento en la terapia contra el cáncer es la selectividad del tratamiento contra las células tumorales. Como se mencionó anteriormente la quimioterapia presenta una alta toxicidad y una baja selectividad contra las células tumorales (Iqbal et al., 2017); por lo que uno de los objetivos de la terapia con nuestro nanovector fue demostrar esta selectividad utilizando dos líneas celulares tumorales y una línea celular no tumoral.

Los ensayos de viabilidad nos permiten medir de manera indirecta el porcentaje de viabilidad a través de la medición de diferentes parámetros colorimétricos, fluorométricos y bioluminiscentes, con lo que evaluamos el efecto citotóxico *in vitro* para así determinar la selectividad de nuestros diferentes tratamientos (Riss & Moravec, 2004).

Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT y la tinción nuclear de DAPI, muestran cómo el tratamiento con los cCNTs presenta un efecto citotóxico mayor en las células no tumorales HEK293, a diferencia de lo observado en las células tumorales HeLa y MDA-MB-231, las cuales mostraron una menor afectación a este tratamiento. Esto puede ser debido a que como está descrito en la literatura, el efecto citotóxico *per se* de los CNTs está dado principalmente por el tamaño y por las impurezas generadas durante el proceso de síntesis (Cui et al., 2010).

Aunque existen diversos estudios contradictorios que han sido publicados desde la síntesis de los CNTs, los más recientes mencionan que los MWCNTs más cortos tienen un efecto citotóxico mayor, lo que coincide con lo encontrado en nuestro trabajo en las líneas tumorales

debido al acortamiento que sufren en el proceso de oxidación por el tratamiento con los ácidos fuertes (Do et al., 2021).

Esto a diferencia de lo encontrado en la línea no tumoral HEK293, en la que el efecto de funcionalización mostró un efecto contrario al observado en las líneas tumorales HeLa y MDA-MB-231. Este efecto posiblemente se deba a que las células HEK293 no sobreexpresan el receptor CD44 (Ishimoto et al., 2011) como las células HeLa y MDA-MB-231. Por lo que, después de la incorporación del HA para biodirigir nuestro nanovector hacia las células tumorales, las células no tumorales no pueden realizar endocitosis mediada por receptor de grandes cantidades de los nanovector y en consecuencia no provocar este efecto citotóxico (Leyva-González et al., 2021). Estos resultados de selectividad coinciden con los ya descritos previamente por nuestro equipo de investigación en líneas celulares murinas (Salas-Treviño et al., 2019).

Como se mencionó previamente, los resultados con el ensayo de MTT y la tinción nuclear DAPI mostraron resultados similares en las dos líneas celulares tumorales HeLa y MDA-MB-231. Sin embargo, se observó un discreto efecto citotóxico mayor en la línea celular HeLa. Esto puede deberse principalmente por dos motivos: el primero es que el CPT es un fármaco quimioterapéutico de primera línea para el cáncer cervicouterino a diferencia del cáncer de mama que generalmente ocupa la segunda línea de tratamiento (Zhang et al., 2022), y segundo a que la línea celular HeLa presenta una expresión mayor de CD44 (Leyva-González et al., 2021), lo que sugiere una mayor endocitosis mediada por receptor por parte de esta línea tumoral.

Finalmente, uno de los aspectos más importantes al elegir un tratamiento es su mecanismo de acción, debido a que, se pueden realizar múltiples estrategias de terapias combinadas que

resulten más beneficiosas para los pacientes. Es por esto, que decidimos empezar a analizar uno de los mecanismos de muerte que previamente estaba relacionado con los CNTs y con el CPT, como lo es la apoptosis.

La muerte celular se puede manifestar con alteraciones morfológicas microscópicas que han sido descritas desde hace más de 50 años. Históricamente se ha empleado una clasificación para describir estos cambios morfológicos en tres formas: muerte celular tipo I (apoptosis), en la que se presentan contracción citoplasmática, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Muerte celular tipo II (autofagia), que muestra una extensa vacuolización citoplasmática; y muerte celular tipo III (necrosis) en la que ocurre un compromiso de la membrana plasmática con una importante tumefacción (Galluzzi et al., 2007). Algunos de estos cambios como la condensación de la cromatina y la extensa vacuolización en el citoplasma pudieron ser observados en los diferentes tratamientos utilizados en este trabajo.

Aunque en la actualidad el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD), además de recomendar la división de la muerte celular en muerte celular regulada (RCD) y muerte celular accidental (ACD), recomienda también clasificar la morfología desde características completamente apoptóticas hasta completamente necróticas (Lorenzo Galluzzi et al., 2018), por lo que los cambios encontrados en este trabajo se relaciona más con la morfología apoptótica.

Para complementar estos cambios morfológicos encontrados y siguiendo las recomendaciones del NCCD, buscamos mediadores clave involucrados en la vía de la apoptosis, como lo es la activación de la Caspasa-3. Esta es una serina proteasa perteneciente a las Caspasas efectoras y que orchestra la gran mayoría de los cambios morfológicos

observados en los cortes semifinos, además de diversos cambios bioquímicos que han sido descritos (Coleman et al., 2001). Además se realizó el ensayo de TUNEL para detectar fragmentación del ADN, un proceso que sucede durante la apoptosis tardía en el cual también es responsable la Caspasa-3a, con lo que podemos atribuir la muerte celular a la apoptosis dependiente de Caspasas (Nagata, 2005).

En nuestro estudio, el tratamiento con CPT provocó un aumento en la expresión de Caspasa-3a y un mayor número de células TUNEL positivas, este mecanismo de acción perteneciente a los fármacos platinados ya ha sido descrito en la literatura (Wang & Lippard, 2005). De manera similar se observó el comportamiento de los OxCNTs-HA-CPT incluso mostrando una mayor expresión de la Caspasa-3a, así como un mayor número de células TUNEL positivas, por lo que vemos la importancia de este mecanismo de muerte en la terapia con los OxCNTs-HA-CPT.

El comportamiento de los otros tratamientos, observamos principalmente que los cCNTs provocaron una alta toxicidad en las células no tumorales HEK293, sin embargo, estos mostraron un nivel bajo de expresión de Caspasa-3a y un bajo número de células TUNEL positivas, por lo que probablemente algún mecanismo de muerte independiente de Caspasas, como la muerte celular dependiente de autofagia, sea el responsable del mecanismo de muerte de este tratamiento como ya está descrito en la literatura (Tsukahara et al., 2015).

8. CONCLUSIONES

1. Los cCNTs *per se* tienen un efecto citotóxico.
2. Las células tumorales son más resistentes a la citotoxicidad mediada por CPT.
3. Los OxCNTs-HA-CPT son más citotóxicos hacia células tumorales.
4. Los OxCNTs-HA-CPT inducen un efecto citotóxico mediado por apoptosis.

9. PERSPECTIVAS

- Cuantificar el CPT presente en nuestro nanovector.
- Analizar el efecto de nuestro nanovector biodirigido cargado con otros agentes quimioterapéuticos.
- Evaluar otras moléculas para biodirigir el nanovector hacia células tumorales.
- Determinar otros mediadores de muerte celular en la terapia con los OxCNTs-HA-CPT.
- Analizar si la apoptosis se presenta en un modelo *in vivo* de cáncer tratado con nuestro nanovector.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, S., & Taimoor, A. (2009). Functionalization of Carbon Nanotubes: Manufacturing Techniques and Properties of Customized Nanocomponents for Molecular-level Technology. *Recent Patents on Nanotechnology*, 3(2), 154–161. <https://doi.org/10.2174/187221009788490013>
- Alshehri, R., Ilyas, A. M., Hasan, A., Arnaout, A., Ahmed, F., & Memic, A. (2016). Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8149–8167. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01770>
- Arlt, M., Haase, D., Hampel, S., Oswald, S., Bachmatiuk, A., Klingeler, R., Schulze, R., Ritschel, M., Leonhardt, A., Fuessel, S., Büchner, B., Kraemer, K., & Wirth, M. P. (2010). Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death. *Nanotechnology*, 21(33). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/33/335101>
- Awasthi, K., Srivastava, A., & Srivastava, O. N. (2005). Synthesis of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(10), 1616–1636. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.407>
- Balas, M., Constanda, S., Duma-Voiculescu, A., Prodana, M., Hermenean, A., Pop, S., Demetrescu, I., & Dinischiotu, A. (2016). Fabrication and toxicity characterization of a hybrid material based on oxidized and aminated MWCNT loaded with carboplatin. *Toxicology in Vitro*, 37, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.011>
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., & Tan, W. (2016).

Nanotechnology in therapeutics : a focus on nanoparticles as a drug delivery system Review. *Carbohydrate Polymers*, 1(1), 71–88.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.07.004>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087616300502>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.026>
<http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482&year=2014&volume=10&issue=>

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>

Chen, W. E. I., Duan, L. I. N., & Wang, L. (2008). Adsorption of Hydroxyl- and Amino-Substituted Aromatics to Carbon Nanotubes. 42(18), 6862–6868.

Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M. F., Heart, N., Hospital, R. B., Street, S., & Sw, L. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. 3(April), 339–346.

Cui, D., Ma, J., Liang, T., Sun, L., Meng, L., Liang, T., & Li, Q. (2019). Selenium nanoparticles fabricated in laminarin polysaccharides solutions exert their cytotoxicities

- in HepG2 cells by inhibiting autophagy and promoting apoptosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 829–835.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.031>
- Cui, H. F., Vashist, S. K., Al-Rubeaan, K., Luong, J. H. T., & Sheu, F. S. (2010). Interfacing carbon nanotubes with living mammalian cells and cytotoxicity issues. *Chemical Research in Toxicology*, 23(7), 1131–1147. <https://doi.org/10.1021/tx100050h>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Davis, M. E., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771–782.
<https://doi.org/10.1038/nrd2614>
- de Mello Gomes, Á. N., Nagai, M. A., Lourenço, S. V., & Coutinho-Camillo, C. M. (2019). Apoptosis and proliferation during human salivary gland development. *Journal of Anatomy*, 234(6), 830–838. <https://doi.org/10.1111/joa.12970>
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103–1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Do, N. T., Kim, S., Kwak, M., Lee, T. G., Jo, D. G., Lee, S. W., & Kim, S. H. (2021). Length difference of multi-walled carbon nanotubes generates differential cytotoxic responses. *Journal of Applied Toxicology*, 41(9), 1414–1424. <https://doi.org/10.1002/jat.4132>
- Dresselhaus, M. S., Jorio, A., Souza Filho, A. G., & Saito, R. (2010). Defect characterization

- in graphene and carbon nanotubes using Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1932), 5355–5377. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0213>
- Ebbesen, T. W., & Ajayan, P. M. (1992). Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, 359, 710–713.
- Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester, R. F., & Wolff, J. A. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic acid (Aminopterin). *The New England Journal of Medicine*, 306(13), 802–805.
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Farvadi, F., Tamaddon, A. M., Sobhani, Z., & Abolmaali, S. S. (2017). Polyionic complex of single-walled carbon nanotubes and PEG-grafted-hyperbranched polyethyleneimine (PEG-PEI-SWNT) for an improved doxorubicin loading and delivery: development and in vitro characterization. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(5), 855–863. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1181642>
- Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>
- Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., & Ping Dou, Q. (2010). Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), 1813–1825.

<https://doi.org/10.2174/138161210791209009>

- Fu, K., & Sun, Y. P. (2003). Dispersion and solubilization of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 3(5), 351–364. <https://doi.org/10.1166/jnn.2003.225>
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
- Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Gomez-Gualdrón, D. A., Burgos, J. C., Yu, J., & Balbuena, P. B. (2011). Carbon nanotubes: Engineering biomedical applications. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 104). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00005-X>
- Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., & Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(4), 897–900. <https://doi.org/10.1021/bc049951i>
- Guo, Q., Shen, X. tao, Li, Y. yuan, & Xu, S. qing. (2017). Carbon nanotubes-based drug

- delivery to cancer and brain. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 37(5), 635–641. <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1783-z>
- Guo, T., Nikolaev, A., Thess, D. T., & Colbert, R. E. S. (1995). Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters*, 243(1–2), 49–54. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(95\)00825-O](https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00825-O)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, J. M., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>
- Hussain, S., Ji, Z., Taylor, A. J., Degraff, L. M., George, M., Tucker, C. J., Chang, C. H., Li, R., Bonner, J. C., & Garantziotis, S. (2016). Multiwalled Carbon Nanotube Functionalization with High Molecular Weight Hyaluronan Significantly Reduces Pulmonary Injury. *ACS Nano*, 10(8), 7675–7688. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03013>
- IARC. (2020). World cancer report 2020. In *World Health Organization*. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56–58.
- Iqbal, J., Anwar, F., & Afridi, S. (2017). Targeted Drug Delivery Systems and Their Therapeutic Applications in Cancer and Immune Pathological Conditions. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 17(3). <https://doi.org/10.2174/1871526517666170606102623>

- Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., ... Saya, H. (2011). CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc- and Thereby Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell*, *19*(3), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.038>
- Jin, R., Liu, L., Zhu, W., Li, D., Yang, L., Duan, J., Cai, Z., Nie, Y., Zhang, Y., Gong, Q., Song, B., Wen, L., Anderson, J. M., & Ai, H. (2019). Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling. *Biomaterials*, *203*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.026>
- Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N. M., Yeo, K. S., Khalid, M., & Bing, C. H. (2019). Comparison of Drying Method on Acid-functionalized Multi-walled Carbon Nanotube and their Application for Dye Removal. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *495*(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/495/1/012057>
- Kavosi, A., Hosseini Ghale Noei, S., Madani, S., Khalighfard, S., Khodayari, S., Khodayari, H., Mirzaei, M., Kalhori, M. R., Yavarian, M., Alizadeh, A. M., & Falahati, M. (2018). The toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26790-x>
- Kearns, O., Camisasca, A., & Giordani, S. (2022). Hyaluronic Acid-Conjugated Carbon Nanomaterials for Enhanced Tumour Targeting Ability. *Molecules*, *27*(48).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27010048> Academic

- Kennedy, L. B., & Salama, A. K. S. (2020). A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *70*(2), 86–104. <https://doi.org/10.3322/caac.21596>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2010). Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine*, *17*(2), 121–130.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Leyva-González, C. A., Salas-Treviño, D., Contreras-Torres, F. F., Loera-Arias, M. de J., Gómez-Tristán, C. A., Piña-Mendoza, E. Í., García-Rivas, G. de J., Montes-De-Oca-Luna, R., Guillén-Meléndez, G. A., Saucedo-Cárdenas, O., & Soto-Domínguez, A. (2021). Hyaluronate Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes Loaded with Carboplatin Enhance Cytotoxicity on Human Cancer Cell Lines. *Materials*.
- Li, J., Qi, S., Lee, S., Ranjan, T., & Wiratama, G. (2019). Carbon nanotube bottles for incorporation, release and enhanced cytotoxic effect of cisplatin. *50*(4), 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.043>. Carbon
- Li, L., Li, L., Zhou, X., Yu, Y., Li, Z., Zuo, D., & Wu, Y. (2019). Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca²⁺/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains. *Nanotoxicology*, *13*(3), 369–391.

<https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1550226>

Liu, D., Zhang, Q., Wang, J., Fan, L., Zhu, W., & Cai, D. (2019). Hyaluronic acid-coated single-walled carbon nanotubes loaded with doxorubicin for the treatment of breast cancer. *Pharmazie*, 74(2), 83–90. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8152>

Livshits, Z., Rao, R. B., & Smith, S. W. (2014). An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(1), 167–203. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.09.002>

Marchesan, S., Melchionna, M., & Prato, M. (2015). Wire Up on Carbon Nanostructures! How To Play a Winning Game. *ACS Nano*, 9(10), 9441–9450. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04956>

Martin, S. J. (2014). Caspases: Executioners of Apoptosis. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 16, 145–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01411-8>

Maruyama, K., Haniu, H., Saito, N., Matsuda, Y., Tsukahara, T., Kobayashi, S., Tanaka, M., Aoki, K., Takanashi, S., Okamoto, M., & Kato, H. (2015). Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial cells. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/793186>

Mehra, N. K., & Palakurthi, S. (2016). Interactions between carbon nanotubes and bioactives: A drug delivery perspective. *Drug Discovery Today*, 21(4), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.011>

Migliore, L., Saracino, D., Bonelli, A., Colognato, R., D'Errico, M. R., Magrini, A., Bergamaschi, A., & Enrinco, B. (2010). Carbon Nanotubes Induce Oxidative DNA

- Damage in RAW 264.7 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 405(April), 391–405. <https://doi.org/10.1002/em>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Moosavi, M. A., Sharifi, M., Ghafary, S. M., Mohammadalipour, Z., Khataee, A., Rahmati, M., Hajjarian, S., Łos, M. J., Klonisch, T., & Ghavami, S. (2016). Photodynamic N-TiO₂ nanoparticle treatment induces controlled ROS-mediated autophagy and terminal differentiation of leukemia cells. *Scientific Reports*, 6(October), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep34413>
- Morales-Torres, S., Silva, T. L. S., Pastrana-Martínez, L. M., Brandão, A. T. S. C., Figueiredo, J. L., & Silva, A. M. T. (2014). Modification of the surface chemistry of single- and multi-walled carbon nanotubes by HNO₃ and H₂SO₄ hydrothermal oxidation for application in direct contact membrane distillation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(24), 12237–12250. <https://doi.org/10.1039/c4cp00615a>
- Mubarak, N. M., Abdullah, E. C., Jayakumar, N. S., & Sahu, J. N. (2014). An overview on methods for the production of carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1186–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.001>
- Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology*, 23, 853–875. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811>
- Negri, V., Pacheco-Torres, J., Calle, D., & López-Larrubia, P. (2020). Carbon Nanotubes in

- Biomedicine. In *Topics in Current Chemistry* (Vol. 378, Issue 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8>
- Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 36(2), 145–164. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>
- Prakash, S., Malhotra, M., Shao, W., Tomaro-Duchesneau, C., & Abbasi, S. (2011). Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(14–15), 1340–1351. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.013>
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>
- Ray, P. C., Yu, H., & Fu, P. P. (2009). Toxicity and environmental risks of nanomaterials: Challenges and future needs. In *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* (Vol. 27, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/10590500802708267>
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62. <https://doi.org/10.1089/154065804322966315>
- Rojas, A. Y., Aguado, C. K., & Gonzalez, M. I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química*, 286–291.

- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., & Mansour, V. H. (1969). Platinum Coumpounds a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 224, 177–178. <http://adsabs.harvard.edu/abs/1969Natur.224..177K>
- Salas-Treviño, D., Saucedo-Cárdenas, O., De Jesús Loera-Arias, M., Rodríguez-Rocha, H., García-García, A., Montes-De-Oca-Luna, R., Piña-Mendoza, E. I., Contreras-Torres, F. F., García-Rivas, G., & Soto-Domínguez, A. (2019). Hyaluronate functionalized multi-wall carbon nanotubes filled with carboplatin as a novel drug nanocarrier against murine lung cancer cells. *Nanomaterials*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/nano9111572>
- Salehcheh, M., Alboghobeish, S., Dehghani, M. A., & Zeidooni, L. (2020). Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress, apoptosis, and dysfunction in isolated rat heart mitochondria: protective effect of naringin. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13447–13456. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07943-w>
- Saravanakumar, K., Jeevithan, E., Chelliah, R., Kathiresan, K., Wen-Hui, W., Oh, D. H., & Wang, M. H. (2018). Zinc-chitosan nanoparticles induced apoptosis in human acute T-lymphocyte leukemia through activation of tumor necrosis factor receptor CD95 and apoptosis-related genes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.017>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37.

<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>

Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.

Oncogene, 22(47 REV. ISS. 6), 7265–7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>

SMeO. (2016). *PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO OPORTUNO EN CÁNCER*.

https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf

Snyder, R. J., Verhein, K. C., Vellers, H. L., Burkholder, A. B., Garantziotis, S., &

Kleeberger, S. R. (2019). Multi-walled carbon nanotubes upregulate mitochondrial gene expression and trigger mitochondrial dysfunction in primary human bronchial epithelial

cells. *Nanotoxicology*, 13(10), 1344–1361.

<https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1655107>

Song, L., Pan, Z., Zhang, H., Li, Y., Zhang, Y., Lin, J., Su, G., Ye, S., Xie, L., Li, Y., & Hou,

Z. (2017). Dually folate/CD44 receptor-targeted self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for dual-drug delivery and combination cancer therapy. *Journal of*

Materials Chemistry B, 5(33), 6835–6846. <https://doi.org/10.1039/c7tb01548h>

Sridhar, S., Botbol, Y., MacIain, F., & Cuervo, A. M. (2012). Autophagy and disease: Always

two sides to a problem. *Journal of Pathology*, 226(2), 255–273.

<https://doi.org/10.1002/path.3025>

Srivastava, R. K., Pant, A. B., Kashyap, M. P., Kumar, V., Lohani, M., Jonas, L., & Rahman,

Q. (2011). Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicology*, 5(2), 195–207.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2010.503944>

Strasser, A., & Vaux, D. L. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer.

Molecular Cell, 78(6), 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>

Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(02), i–iv. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>

Tao, J. (2013). FTIR and Raman studies of structure and bonding in mineral and organic-mineral composites. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 532). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416617-2.00022-9>

Tsukahara, T., Matsuda, Y., & Haniu, H. (2015). The role of autophagy as a mechanism of toxicity induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 40–48. <https://doi.org/10.3390/ijms16010040>

Țucureanu, V., Matei, A., & Avram, A. M. (2016). FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(6), 502–520. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013>

Van der Vijgh, W. J. F. (1991). Clinical Pharmacokinetics of Carboplatin. *Clinical Pharmacokinetics*, 21(4), 242–261. <https://doi.org/10.2165/00003088-199121040-00002>

Vardharajula, S., Ali, S. Z., Tiwari, P. M., Eroğlu, E., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2012). Functionalized carbon nanotubes: Biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5361–5374. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35832>

Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>

- Wisdom, K. S., Bhat, I. A., Chanu, T. I., Kumar, P., Pathakota, G. B., Nayak, S. K., Walke, P., & Sharma, R. (2020). Chitosan grafting onto single-walled carbon nanotubes increased their stability and reduced the toxicity in vivo (catfish) model. *International Journal of Biological Macromolecules*, *155*, 697–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.189>
- Wu, B., Jiang, M., Liu, X., Huang, C., Gu, Z., & Cao, Y. (2020). Evaluation of toxicity of halloysite nanotubes and multi-walled carbon nanotubes to endothelial cells in vitro and blood vessels in vivo. *Nanotoxicology*, *14*(8), 1017–1038. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1780642>
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, *39*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Yang, S., Wang, Z., Ping, Y., Miao, Y., Xiao, Y., Qu, L., Zhang, L., Hu, Y., & Wang, J. (2020). PEG/PEI-functionalized single-walled carbon nanotubes as delivery carriers for doxorubicin: synthesis, characterization, and in vitro evaluation. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *11*, 1728–1741. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.155>
- Yeo, E. S. Y., Mathys, G. I., Brack, N., Thostenson, E. T., & Rider, A. N. (2017). Functionalization and dispersion of carbon nanomaterials using an environmentally friendly ultrasonicated ozonolysis process. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(123), 1–9. <https://doi.org/10.3791/55614>
- Yohan, D., & Chithrani, B. D. (2014). Applications of nanoparticles in nanomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *10*(9), 2371–2392.

<https://doi.org/10.1166/jbn.2014.2015>

Yuan, X., Nie, W., He, Z., Yang, J., Shao, B., Ma, X., Zhang, X., Bi, Z., Sun, L., Liang, X., Tie, Y., Liu, Y., Mo, F., Xie, D., Wei, Y., & Wei, X. (2020). Carbon black nanoparticles induce cell necrosis through lysosomal membrane permeabilization and cause subsequent inflammatory response. *Theranostics*, *10*(10), 4589–4605.

<https://doi.org/10.7150/thno.34065>

Zhang, C., Xu, C., Gao, X., & Yao, Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*, *12*(5), 2115–2132.

<https://doi.org/10.7150/thno.69424>

Zhang, P., Teng, J., & Wang, L. (2020). Multiwalled carbon nanotubes inhibit cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton via mitochondrial dysfunction in ovarian cancer cells. *Aging*, *12*(24), 25294–25303. <https://doi.org/10.18632/aging.104130>

Zhuang, Y., Zhao, L., Zheng, L., Hu, Y., Ding, L., Li, X., Liu, C., Zhao, J., Shi, X., & Guo, R. (2017). LAPONITE-Polyethylenimine Based Theranostic Nanoplatfor for Tumor-Targeting CT Imaging and Chemotherapy. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, *3*(3), 431–442. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00528>