

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**EVALUACION DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE
NANOTUBOS DE CARBONO CON
FIBROBLASTOS DE RATÓN NIH-3T3**

Tesis que presenta

José Gil Munguía López

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2012



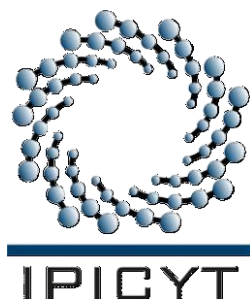
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación de la biocompatibilidad de nanotubos de carbono con fibroblastos de ratón NIH-3T3**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Gil Munguía López** y aprobada el **18 de 06 de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
(Director de la tesis)

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Miembro del Comité Tutorial)

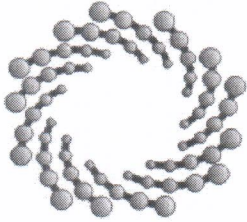
Dr. Carlos Barajas López
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular y el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 250279.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 099 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López

Presidente

IPICYT

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Secretaria

IPICYT

Dr. Antonio De León Rodríguez

Sinodal

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Gil Munguía López

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación de la biocompatibilidad de nanotubos de carbono con fibroblastos de ratón NIH-3T3

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

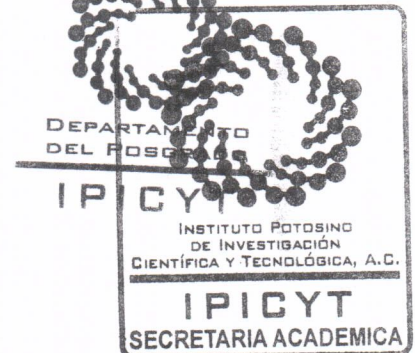
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de julio de 2012.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mis amigos, a mis sobrinos, a mis hermanas y a mis padres...

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Antonio De León Rodríguez por compartir sus conocimientos, su disponibilidad, por todo el apoyo y asesoría que me brindó durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y al Dr. Carlos Barajas López por sus valiosas aportaciones para mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Fernando J. Rodríguez Macías por la gentil donación de nanotubos de carbono para el presente trabajo y por sus valiosos comentarios.

A Leandro Gabriel Ordoñez por su gran apoyo técnico, disponibilidad, facilidades otorgadas y amistad.

A mis amigos Néstor Jiménez, Mabel Guzmán, Ángel Huerta, Esri Juárez, Raúl Loera, Karina Robledo, Ivonne Solís y Zazil Alvarado por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis compañeros del Laboratorio 4 por compartir todos esos momentos que nos unieron como grupo de trabajo.

A mis compañeros de la maestría generación 2010-2012 y a las demás personas del IPICYT que me brindaron su amistad durante todo este tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 250279 y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

A Verónica Zarate Chávez por su apoyo técnico en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT.

Al Dr. Miguel Ávalos por el apoyo en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del IPICYT.

Por último agradezco a mi familia por todo su apoyo y a todas las personas que conocí fuera de la institución por su amistad y palabras de aliento en momentos difíciles. A todos muchas gracias.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	4
2.1. Síntesis y dispersión de nanotubos	4
2.2. Pruebas de biocompatibilidad de nanotubos con células de mamíferos	4
2.3. Análisis estadístico	6
2.4. Extracción de proteína total de fibroblastos de ratón NIH-3T3 expuestos a nanotubos	7
2.5. Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes	7
3. Resultados y discusión	9
3.1. Dispersión de nanotubos de carbono	9
3.2. Efecto de los CNx y MWCNT sobre el crecimiento de fibroblastos de ratón NIH-3T3	11
3.3. Influencia de los nanotubos de carbono sobre la velocidad específica de crecimiento y concentración de fibroblastos NIH-3T3	15
3.4. Análisis del proteoma de fibroblastos de ratón expuestos a MWCNT y CNx	18
4. Conclusiones	21
5. Referencias	22

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Ensayos de exposición de nanotubos de carbono con fibroblastos de ratón NIH-3T3	5

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Dispersión de CNx y MWCNT	10
Figura 2. CNx y MWCNT dispersos en medio IMDM suplementado	10
Figura 3. Micrografías de SEM de los nanotubos de carbono	12
Figura 4. Cinética de crecimiento de fibroblastos de ratón NIH-3T3 incubados con nanotubos de carbono	13
Figura 5. Efecto de los CNx y MWCNT sobre la morfología de los fibroblastos de ratón NIH-3T3	16
Figura 6. Velocidad específica de crecimientos de fibroblastos de ratón NIH-3T3	17
Figura 7. Concentración de fibroblastos de ratón NIH-3T3 a las 96 h de cultivo con nanotubos	19
Figura 8. Imagen representativa de geles 2D de proteínas totales extraídas de cultivos fibroblastos de ratón expuestos a nanotubos de carbono	20

Anexos

Perspectivas

Página
25

Resumen

Evaluación de la biocompatibilidad de nanotubos de carbono con fibroblastos de ratón NIH-3T3

Los nanotubos de carbono son cilindros huecos de grafeno cuyas dimensiones son de nanoescala. Dadas sus peculiares características químicas, físicas, eléctricas y térmicas se han buscado sus posibles aplicaciones en la industria y biomedicina. En este último campo, las investigaciones de respuesta celular a nanotubos de carbono puros (MWCNT) o funcionalizados han sido extensas y a la vez inconsistentes y contradictorias. Se ha propuesto que los nanotubos dopados con nitrógenos (CNx) presentan mejor biocompatibilidad celular que los puros o funcionalizados. En esta investigación se evaluó el efecto de MWCNT y CNx sobre fibroblastos de ratón usando distintas concentraciones de los nanomateriales y diferentes ensayos de exposición. Los resultados obtenidos mostraron que los CNx se dispersan mejor que los MWCNT en medio de cultivo, agua destilada y etanol. También se encontró que la respuesta celular depende de la concentración de nanotubos y del ensayo de exposición, siendo los CNx los que mayor biocompatibilidad tienen con los fibroblastos. En general, los resultados muestran que los CNx son menos tóxicos que los MWCNT.

PALABRAS CLAVE: Nanotubos de carbono; nanotubos de carbono N-dopados; dispersión; biocompatibilidad; fibroblastos.

Abstract

Evaluation of carbon nanotubes biocompatibility with NIH-3T3 mouse fibroblasts

Carbon nanotubes (CNTs) are graphitic sheets grown as hollow cylinders with diameters on the order of only few nanometers (2 to 200 nm) and the lengths ranging from hundred of nanometers to micrometers. Due to their unique chemical, physical, electrical and thermal properties there has been much interest to find applications in industrial and biomedical fields. In the latter field, researches of cellular response to either non-functionalized or functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) have been extensive. The chemical doping with nitrogen of CNTs (CNx) has been suggested to have positive effects on cellular biocompatibility than MWCNT. In this study, we evaluated the effects of MWCNT and CNx on mouse fibroblast cells (NIH-3T3) using different concentrations and exposed assays. Results showed that CNx was better dispersed than MWCNT in culture medium, ethanol and water. We found that cell toxicity is concentration dependent and the exposed assay influences on biocompatibility of CNTs. In general, our results suggested that CNx are less toxic than MWCNT.

KEY WORDS: Carbon nanotubes; N-doped carbon nanotubes; dispersion; biocompatibility; fibroblasts.

1. Introducción

Un gran número de nanomateriales han sido desarrollados para diversas aplicaciones en campos industriales, eléctricos, agrícolas, farmacéuticos y médicos (Sohaebuddin et al. 2010). Debido a sus características físicas, químicas y eléctricas, desde su descubrimiento en 1991 (Iijima 1991) y hasta la fecha, los nanotubos de carbono (CNTs) han tomado gran interés en biomedicina para la regeneración de los tejidos empleados como andamios, la liberación de fármacos y el diagnóstico médico (Ferreira et al. 2008).

Los CNTs están formados por una, dos o más capas de cilindros de grafeno (capa individual de grafito) huecos arreglados concéntricamente. Tienen una longitud de nanómetros a milímetros micrómetros (2 nm hasta 10 mm) y un diámetro de 0.4 a 2 nm para los nanotubos de pared simple (SWCNT) y de 2 a 200 nm para los MWCNT (Cui et al. 2010, Iijima 1991, Zhao et al. 2011). Debido a que los CNTs tienen una forma similar al asbesto, a sus características físico-químicas y a su producción a gran escala, se han intensificado las investigaciones sobre su toxicidad y el posible riesgo a la salud humana que representa la exposición a estos nanomateriales (Haniu et al. 2011, Kunzmann et al. 2011, Sohaebuddin et al. 2010, Wang et al. 2012).

Aunque, a la fecha, no han asociado enfermedades humanas a la exposición con CNTs (Wang et al. 2012), varios ensayos biológicos han demostrado que pueden ser tóxicos tanto para las células animales, órganos y organismos completos generando estrés oxidativo, alteraciones en la estructura de la actina, genotoxicidad, inflamación, fibrosis y granulomas (Carrero-Sanchez et al. 2006, Cui et al. 2010, Holt et al. 2010, Kunzmann et al. 2011, Liu et al. 2010, Nam et al. 2011, Pacurari et al. 2012, Wang et al. 2012), lo cual se traduce en riesgos para las aplicaciones biomédicas.

Por otro lado, la modificación química de los CNTs mediante *a*) adición de grupos funcionales en su superficie (funcionalización) o *b*) sustitución de carbonos por boro o nitrógeno en las hojas de grafeno de las paredes de los nanotubos de

carbono (dopaje), ha mostrado tener efectos positivos en las propiedades estructurales y biocompatibilidad de los MWCNT para su uso en biomedicina (Carrero-Sanchez et al. 2006, Zhao et al. 2011).

La respuesta celular (biocompatibilidad/toxicidad) a CNTs depende de diversos factores como el método de síntesis, tamaño, pureza, tipo de nanotubos; el grado de dispersión/aglomeración, el dispersante usado, la concentración de CNTs, el tiempo de exposición y tipo celular (Carrero-Sanchez et al. 2006, Cui et al. 2010, Haniu et al. 2011, Sohaebuddin et al. 2010).

Se han seguido distintas estrategias para evaluar el efecto de los CNTs sobre células de mamíferos. El MTT [bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)] (Liu et al. 2010, Nayak et al. 2010, Yuan et al. 2011) y el *AlamarBlue* assay (Haniu et al. 2011, Mooney et al. 2008) son empleados para determinar la proliferación celular; no obstante, se ha reportado que estos colorantes interactúan con los CNTs resultado en datos erróneos de viabilidad (Ciofani et al. 2010, Cui et al. 2010, Qi et al. 2011, Worle-Knirsch et al. 2006). Por otro lado, el ensayo de azul de tripano (Bottini et al. 2006, Zhao et al. 2011) o el uso del colorante MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (Meng et al. 2009, Sohaebuddin et al. 2010) han mostrado ser una opción idónea para la determinación de la viabilidad celular.

Recientemente se ha propuesto un método basado en proteómica para evaluar la seguridad de los CNTs (Haniu et al. 2010). El análisis de proteoma se usa para establecer las funciones celulares en respuesta a varios estímulos externos y la variación en los niveles de expresión de proteína reflejan la respuesta biológica. Pese a las posibles aplicaciones biomédicas de los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CNx), son escasos los reportes referentes a su biocompatibilidad con células de mamíferos para su uso en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Hasta la fecha no existen estudios que evalúen el efecto que tienen los CNx con células animales a nivel de proteoma; por consiguiente, es de gran importancia determinar de manera cuantitativa los cambios en el perfil proteómico de la células en respuesta al estímulo de los MWCNT y CNx, esto

permitiría tener un entendimiento fundamental sobre la interacción entre estos nanomateriales y las células de mamíferos.

En este trabajo, los CNx y MWCNT fueron dispersados en agua, etanol y medio de cultivo. Cada una de estas soluciones de nanotubos se incubó en distintos tiempos con fibroblastos de ratón NIH-3T3 y se evaluó el efecto que tienen estos CNTs sobre la proliferación y morfología celular. También se estandarizó la técnica de electroforesis en dos dimensiones (2D) para el análisis del perfil proteómico de fibroblastos expuestos a CNx y MWCNT.

2. Materiales y métodos

2.1. Síntesis y dispersión de nanotubos

Los CN_x y MWCNT fueron gentilmente donados por el Dr. Fernando J. Rodríguez Macías del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología (IPICYT). Los nanotubos se produjeron por el método de deposición química de vapor (Kamalakaran et al. 2000) utilizando 2.5% (p/v) de ferroceno en tolueno (o bencilamina para los CN_x) en un nebulizador ultrasónico. El aerosol fue llevado por un flujo de 2.5 L/min de argón en un horno de tubo de cuarzo a temperatura constante de 800 °C (850 °C para CN_x), durante 30 min. Los nanotubos se purificaron por dispersión de los mismos usando pulsos de sonicación en agua bajo reflujo, seguidos por reflujo en HCl 6 M y microfiltración.

Los CN_x y MWCNT (1 mg/mL) se dispersaron en 1) medio de cultivo [Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM) (SIGMA) pH 7.2 suplementado con suero fetal bovino 10% (GIBCO), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y anfotericina 0.25 µg/mL (SIGMA)], 2) etanol absoluto o 3) agua destilada mediante sonicación en un baño ultrasónico (Branson 2510 Ultrasonic Cleaner, 100 W, 42 kHz) durante 30 min a 40°C. Las soluciones se dejaron en reposo por 24 h a temperatura ambiente y, cualitativamente, se analizó la dispersión de las mismas mediante sedimentación de los nanotubos de carbono. Mediante microscopia electrónica de barrido o SEM (scanning electron microscopy) se analizaron los CN_x y MWCNT (700 µg/mL) dispersos en medio de cultivo.

2.2. Pruebas de biocompatibilidad de nanotubos con células de mamíferos

El efecto de los nanotubos de carbono (CN_x y MWCNT) sobre los fibroblastos de ratón NIH-3T3 se analizó usando tres ensayos de exposición distintos, resumidos en la Tabla 1. La proliferación celular se determinó mediante el método colorimétrico de reducción de MTS.

Tabla 1. Ensayos de exposición de nanotubos de carbono con fibroblastos de ratón NIH-3T3

Descripción	Nanotubos de carbono dispersos en	Tiempo de adición de CNx o MWCNT a los cultivos
<i>Ensayo A</i>	Medio de cultivo	Inmediatamente después de disociar los fibroblastos NIH-3T3 con tripsina
<i>Ensayo B</i>	Etanol absoluto	24 h antes de agregar las células NIH-3T3. El etanol se dejó evaporar
<i>Ensayo C</i>	Agua destilada	24 h posterior la incubación de los fibroblastos de ratón

Los fibroblastos de ratón NIH-3T3 se descongelaron e incubaron en placas de 24 pozos con medio de cultivo IMDM suplementado durante 72 h en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Después de tres pases celulares y alcanzada una confluencia del 80%, las células de ratón se incubaron con tripsina 0.25% a 37°C e inmediatamente después se sembraron 2x10³ células/pozo (en placas de 96 pozos, CORNING) en presencia de CNx o MWCNT dispersos en medio de cultivo, a concentraciones logarítmicas finales ascendentes (0.07-70 µg/mL), durante 96 h a 37°C y 5% de CO₂ (*Ensayo A*). Los nanotubos de carbono dispersos en etanol absoluto (*Ensayo B*) o en agua destilada (*Ensayo C*) se usaron a concentraciones finales de 7 y 70 µg/mL. Los muestreos se realizaron cada 24 h, utilizando como control fibroblastos de ratón NIH-3T3 sin nanomateriales. Los nanotubos se agitaron por 30 s en vortex antes del contacto con las células.

Por otro lado, se determinó si la morfología de las células era alterada en presencia de CNx o MWCNT (70 µg/mL) dispersos en medio de cultivo, en etanol o en agua empleando los tres ensayos de exposición antes mencionado. Los cultivos celulares incubados durante 96 h con los nanotubos se analizaron mediante microscopio invertido.

La velocidad específica de crecimiento de los fibroblastos se calculó con las pendientes obtenidas a partir de las cinéticas de proliferación de las células en cada uno de los ensayos de exposición empleados en este estudio.

2.3. Análisis estadístico

Los datos son presentados como promedio ± desviación estándar. La comparación estadística se realizó con ANOVA de una y dos vías seguido de las pruebas de Dunnett y Bonferroni, respectivamente. Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

2.4. Extracción de proteína total de fibroblastos de ratón NIH-3T3 expuestos a nanotubos

Una vez alcanzada una confluencia celular del 80%, los fibroblastos se incubaron con tripsina 0.25% a 37°C durante 10 min. Las células se transfirieron a 4 frascos T de 25 cm² (96,000 células/frasco) con 7.2 mL de medio de IMDM suplementado y se incubaron por 24 h (Witzmann and Monteiriviere 2006). Los fibroblastos se expusieron a 0.8 mL de nanotubos dispersos en agua para alcanzar una concentración final de 7 µg/mL de nanomateriales y se incubaron por un periodo de 96 h. A las muestras control (fibroblastos sin nanotubos) se les agregó solo agua.

Se emplearon un total de 8 frascos T para las muestras expuestas a CNx o MWCNT y 4 frascos para las muestras control. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado biológico.

Los fibroblastos de ratón fueron solubilizados directamente en los frascos T (*in situ*). Primero, las células se lavaron tres veces con PBS frío (pH 7.4) e inmediatamente después se lisaron con 2 mL de buffer de lisis frío (urea 7 M, tiourea 2 M, Triton X-100 1%, DTT 100 mM, PMSF 2 mM) (Luche et al. 2003). Se recuperó todo el volumen, se sonicó por 20 min en hielo y las muestras se centrifugaron a 4°C/6,500 rpm/40 min para recuperar el sobrenadante. Las proteínas totales contenidas en el sobrenadante se precipitaron con 4 volúmenes de acetona fría y se incubaron durante 4 h a -20°C. El pellet se recuperó y resuspendió en buffer de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 18 mM, azul de bromofenol 0.002%, anfolitos pH 3-10 0.25%). La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford usando el kit BioRad Protein Assay (BIORAD).

2.5. Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes.

Tiras de IPG de 24 cm, pH 3-10 lineal (ReadyStripTM IPG Strips, BIO-RAD), fueron cargadas con 2 mg de proteína empleando la rehidratación pasiva por 15 h a

20°C. Las muestras se separaron en primera dimensión a 50 μ A/tira a 20°C usando el equipo Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences) bajo un programa de incremento progresivo de voltaje: 150 V por 2 h; 300 V por 2 h; 1,000 V por 2 h; 3,000 V por 3 h; 6,000 V por 3 h y 6,000 V por 10 h.

Finalizada la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, las tiras de IPG se transfirieron a buffer de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCl 50 mM, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, DTT 65 mM), se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min con agitación constante y, enseguida, se colocaron en geles SDS-PAGE al 13% (26 x 20 cm) para la separación de las proteínas basado en su peso molecular. Los geles se corrieron en una cámara Ettan™ DALTSix Electrophoresis Unit (GE Healthcare) a 4°C aplicando una corriente de 15 mA/gel durante 2 h y 40 mA/gel por 4 h. Finalmente, los geles se fijaron por 14 h y tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250 durante 4 h. Los geles se lavaron varias veces con agua destilada y se escanearon a una resolución de 100 μ m/pixel usando el equipo Pharos FX Plus (BIORAD).

3. Resultados y discusión

3.1. *Dispersión de nanotubos de carbono*

La dispersión/aglomeración de nanotubos de carbono tiene un papel importante en la toxicidad sobre células de mamíferos (Sohaebuddin et al. 2010). Los CNx mostraron mayor dispersión que los MWCNT en cualquiera de las tres soluciones empleadas (Figura 1). Después de 24 h de reposo, los CNx no sedimentaron en medio de cultivo, mientras que los MWCNT lo hicieron ligeramente (frasco izquierdo, Figura 1 A). Se ha reportado que el suero fetal bovino actúa como buen surfactante en la dispersión de MWCNT (Rafeeqi and Kaul 2011); aunque esto no significa que las soluciones acuosas de MWCNT sean estables por periodos largos de tiempo (Alpatova et al. 2010). También se observó que la adición de CNx o MWCNT a concentraciones logarítmicas de 700-0.7 $\mu\text{g/mL}$ (soluciones stock) no modificó el pH del medio de cultivo, debido a que el color rosa característico del indicador de pH (rojo fenol) no cambió (Figura 2) (Rafeeqi and Kaul 2011).

Usualmente, la dispersión de MWCNT en soluciones de etanol es muy difícil debido al alto grado de entrelazamiento de las redes de estos nanotubos, las cuales tiende a formar agregados y floculas en la solución y solo una pequeña fracción es realmente dispersa en el etanol (Chun et al. 2006, Yang et al. 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos en presencia de etanol absoluto, la dispersión de los CNx y MWCNT y la estabilidad de la solución fueron similares, después de 12 h ambos nanotubos sedimentaron ligeramente (Figura 1 B). Estudios de MWCNT dopados con potasio (Chun et al. 2006), MWCNT oxidados (Xing et al. 2005) y MWCNT hidrogenados (Yang et al. 2012) han demostrado que este tipo de modificaciones junto con ultrasonificación mejoran la dispersión y estabilidad de los nanotubos en etanol, comparado con los MWCNT sin modificar (Xing et al. 2005, Yang et al. 2012).

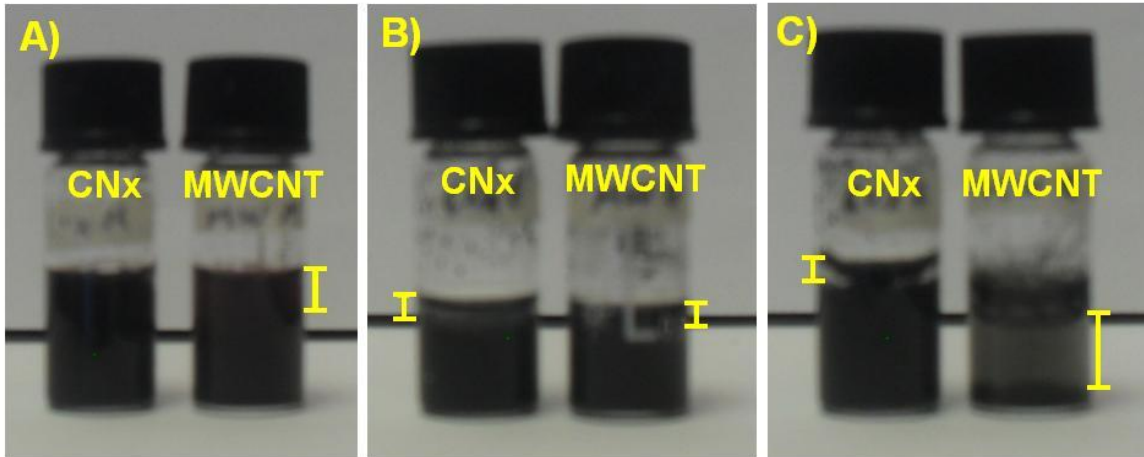


Figura 1. Dispersión de CNx y MWCNT.

Nanotubos dispersos en medio de cultivo (A), etanol absoluto (B) o agua destilada (C). Las barras verticales indican el sobrenadante resultante de la sedimentación de los nanotubos.

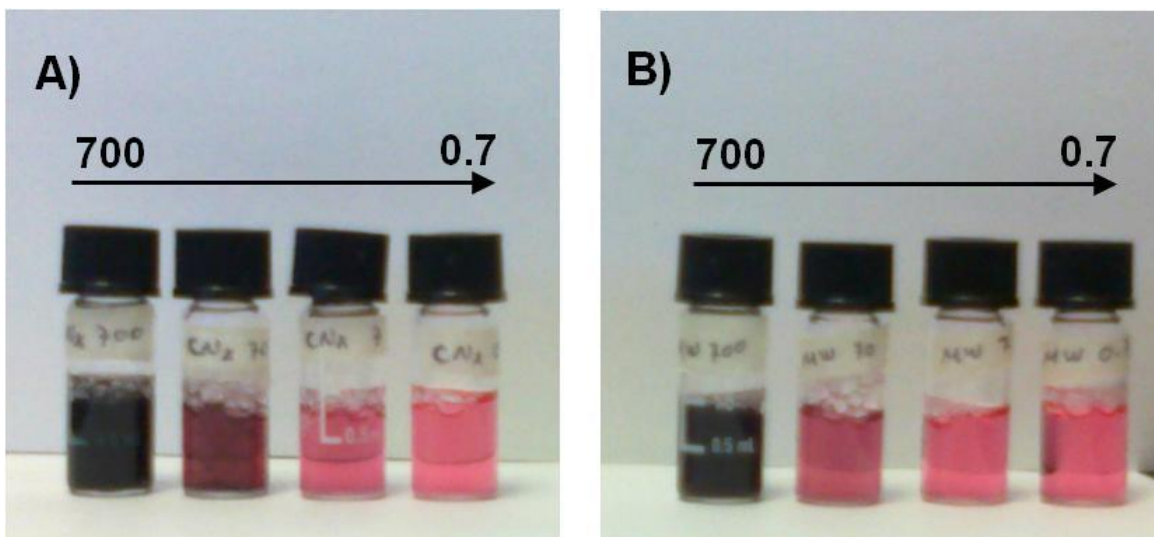


Figura 2. CNx y MWCNT dispersos en medio IMDM suplementado.

Apariencia visual de las distintas concentraciones logarítmicas (0.7-700 $\mu\text{g/mL}$) de CNx (A) y MWCNT (B) dispersadas en medio de cultivo IMDM suplementado después de 24 h en reposo a temperatura ambiente.

Cuando se utilizó agua destilada, la sedimentación de los CNx ocurrió después de las 15 h de reposo y para los MWCNT a los 90 min (Figura 1 C). Esto se debe a la fuerte hidrofobicidad y fuerzas de van der Waals de los MWCNT que tienden a agregarse en soluciones acuosas formando sedimentos (Yang et al. 2012) inmediatamente después de agitarlos (pocos minutos) (Xing et al. 2005) o en un par de horas (Marsh et al. 2007).

También se observó que el nivel de agregación de los nanotubos es dependiente de la concentración de los mismos. Por otro lado, mediante SEM se analizaron floculas obtenidas de las muestras a una concentración de 700 µg/mL de CNx y MWCNT dispersas en medio de cultivo (Figura 3). La separación de los CNx entre sí (barra, Figura 3 A) indica una mejor dispersión en el medio de cultivo comparado con los MWCNT (Figura 3 B). Estos resultados señalan los CNx se dispersan mejor que los nanotubos sin dopar (MWCNT); la presencia de sitios nitrogenados en los CNx podría explicar por qué se dispersaron de manera más estable en distintas soluciones (Kim et al. 2011).

3.2. Efecto de los CNx y MWCNT sobre el crecimiento de fibroblastos de ratón NIH-3T3

El efecto de los nanotubos de carbono (CNx y MWCNT) sobre los fibroblastos de ratón NIH-3T3 se analizó usando tres ensayos de exposición distintos (Tabla 1). La proliferación celular se determinó mediante el método colorimétrico de reducción de MTS. El MTS fue elegido para este estudio debido a la solubilidad del producto reducido en el medio de cultivo y porque se ha demostrado que los nanotubos de carbono interfieren con los ensayos de reducción del MTT (Ciofani et al. 2010, Qi et al. 2011, Worle-Knirsch et al. 2006).

En el *Ensayo A* se observó que concentraciones superiores a 0.7 µg/mL de CNx y 7 µg/mL de MWCNT afectaron significativamente ($p < 0.05$) la cinética de crecimiento celular (Figura 4 A y B, respectivamente). Sin embargo, la concentración más alta de CNx usada en este experimento (70 µg/mL) no fue

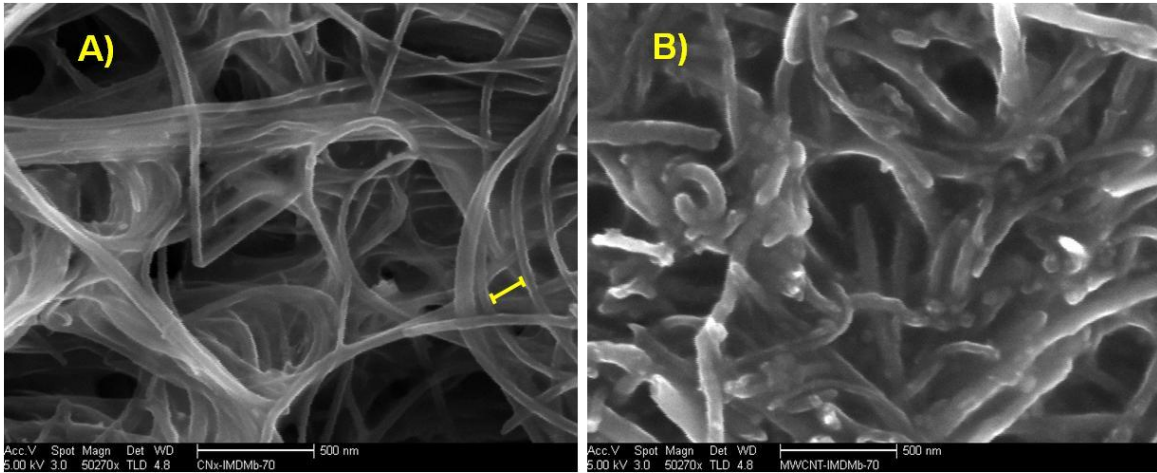


Figura 3. Micrografías de SEM de los nanotubos de carbono.

Los CNx (A) y MWCNT (B) se dispersaron en medio de cultivo. La barra de escala es de 500 nm

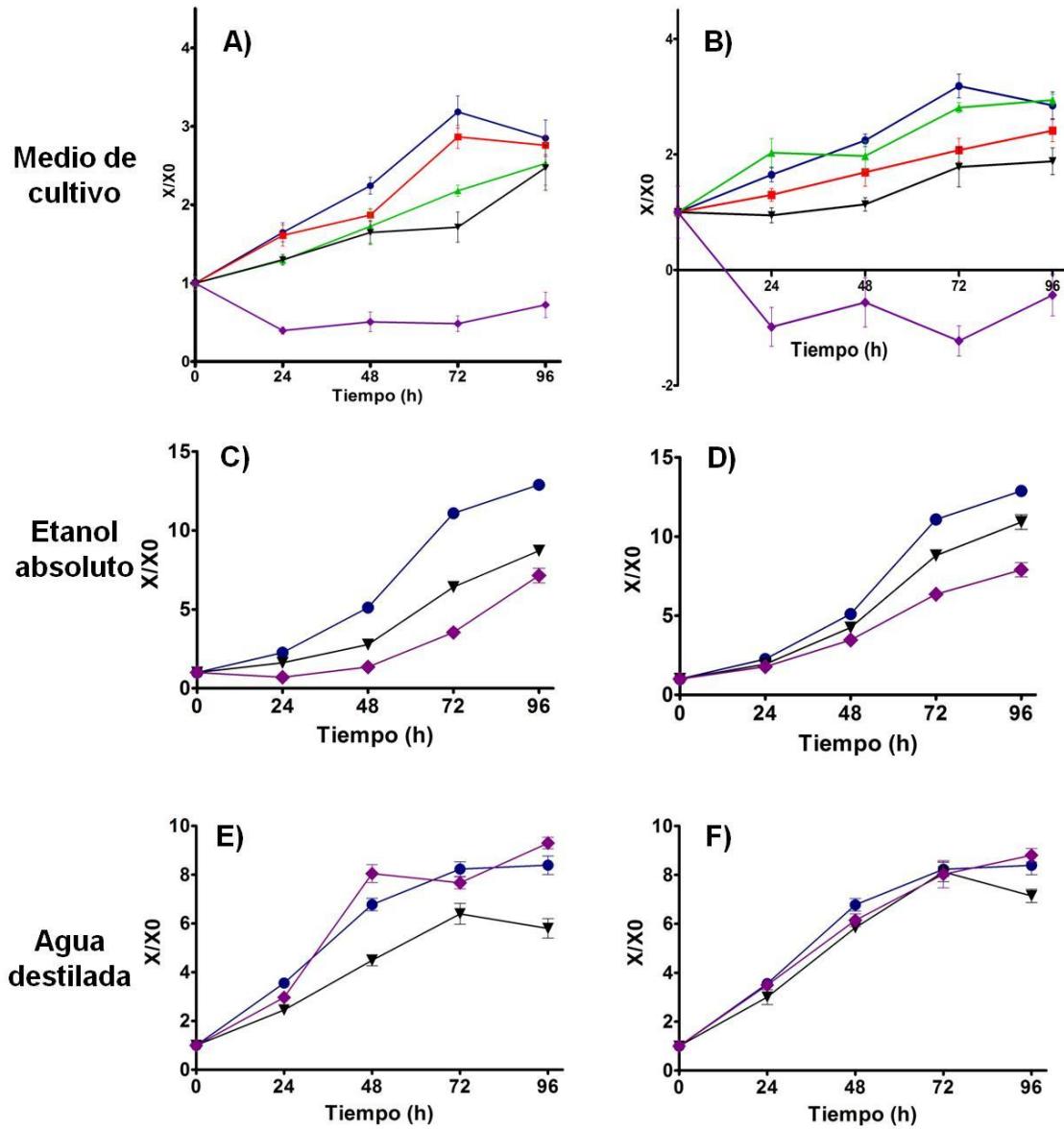


Figura 4. Cinética de crecimiento de fibroblastos de ratón NIH-3T3 incubados con nanotubos de carbono.

Las células se incubaron con CNx (A,C,D) o MWCNT (B,D,F) dispersos en medio de cultivo, en etanol absoluto y en agua destilada. Concentraciones en $\mu\text{g/mL}$:

● 0.0; ■ 0.07; ▲ 0.7; ▼ 7; ◆ 70. $n \leq 6$.

letal para las células (Figura 4 A), mientras que las muestras que contenían MWCNT a esa misma concentración fue letal (Figura 4 B). Sohaebuddin et al. (2010), encontraron que concentraciones 10 µg/mL y 1000 µg/mL de MWCNT disminuyen la viabilidad de fibroblastos en un 20% y 40%, respectivamente, después de ser expuestos a ellos durante 24 h. El tiempo de exposición de nanomateriales con células de mamíferos también influye en la biocompatibilidad, concentraciones de 30 µg/mL de MWCNT disminuye la viabilidad de fibroblastos 3T3 L1 en un 58% y 55% al día 3 y 4, respectivamente, después de la exposición a nanotubos (Meng et al. 2009).

Cuando los CNx o MWCNT se incubaron antes que las células (*Ensayo B*), las cinéticas de crecimiento se afectaron significativamente ($p < 0.05$) y se observó un efecto citotóxico dependiente de la concentración de nanotubos (Figura 4 C y D, respectivamente). No obstante, la concentración de 70 µg/mL de MWCNT no fue letal para los fibroblastos como se observó en resultados anteriores (Figura 4 D vs 4 B).

En el *Ensayo C*, concentraciones de 7 y 70 µg/mL de CNx afectaron significativamente ($p < 0.05$) la cinética de crecimiento (Figura 4 E). Para las muestras con MWCNT, el crecimiento de fibroblastos NIH-3T3 solo se afectó significativamente con MWCNT a una concentración final de 7 µg/mL (Figura 4 F). La respuesta celular (toxicidad/biocompatibilidad) a los nanotubos de carbono se ha atribuido a su tamaño, superficie química, área superficial, pureza, grado de aglomeración, tipo y concentración de dispersante, tiempo de exposición y tipo celular (Buford et al. 2007, Mooney et al. 2008, Sohaebuddin et al. 2010, Zhao et al. 2011). Aunado a lo anterior, los resultados sugieren que el momento de aplicación de nanotubos a los cultivos afecta su biocompatibilidad con los fibroblastos de ratón NIH-3T3.

Por otro lado, se determinó si la morfología de las células se altera en presencia de CNx o MWCNT (70 µg/mL) dispersos en medio de cultivo, en etanol o en agua empleando los tres ensayos de exposición antes mencionado. Los cultivos celulares incubados durante 96 h con los nanotubos se analizaron mediante microscopio invertido.

Cuando se incubaron los fibroblastos NIH-3T3 y los CNx dispersos en medio de cultivo, se observó que la morfología en forma de huso cambió a circular y disminuyó su tamaño (Figura 5 B), mientras que en el cultivo celular con MWCNT no se encontraron células (Figura 5 C). Se ha reportado que la morfología de células madre mesenquimales humanas es alterada cuando se exponen a concentraciones altas (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de MWCNT y SWCNT funcionalizados con OH y COOH, respectivamente, durante un periodo de 6 días (Mooney et al. 2008). Estudios en células HeLa expuestas a SWCNT (Holt et al. 2010) y células endoteliales microvasculares humanas incubadas con MWCNT (Pacurari et al. 2012), mostraron cambios en la morfología de estas células debido a alteraciones en la estructura de la actina y reorganización de la misma.

Al incubar a los fibroblastos con los nanotubos de carbón dispersos en etanol absoluto o en agua destilada (Figura 5 D-F y G-I, respectivamente) no se observaron alteraciones en la morfología de estas células. Estos datos indican que el tiempo de aplicación de nanotubos de carbono (ensayos de exposición) juega un papel importante en la morfología de los fibroblastos NIH-3T3.

3.3. Influencia de los nanotubos de carbono sobre la velocidad específica de crecimiento y concentración de fibroblastos NIH-3T3

La velocidad específica de crecimiento de los fibroblastos se calculó con las pendientes obtenidas a partir de las cinéticas de proliferación de las células en cada uno de los ensayos de exposición empleados en este estudio. Comparados con las muestras control, la velocidad específica de crecimiento de los fibroblastos NIH-3T3 no se afectó significativamente ($p < 0.05$) con la presencia de CNx dispersos en medio de cultivo, en etanol o en agua a ninguna concentración (Figura 6). Lo mismo ocurrió para los MWCNT dispersos en etanol y agua (Figura 6 B y C, respectivamente). Para los MWCNT dispersos en medio de cultivo, concentraciones inferiores a 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no afectaron la velocidad específica de crecimiento de los fibroblastos NIH-3T3 (Figura 6 A).

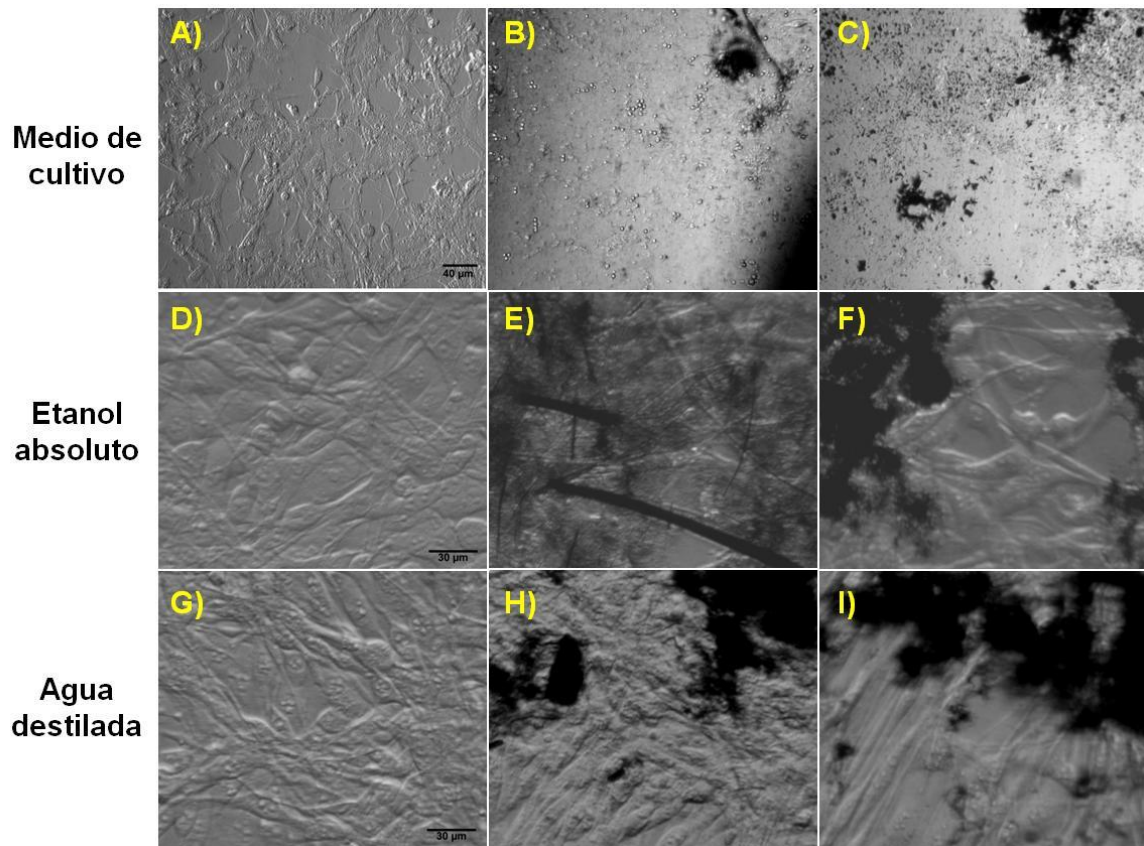


Figura 5. Efecto de los CNx y MWCNT sobre la morfología de los fibroblastos de ratón NIH-3T3.

Las células se incubaron durante 96 h con 70 µg/mL de CNx (B,E,H) o MWCNT (C,F,I) dispersos en medio de cultivo, en etanol absoluto y en agua destilada. Como control se usaron fibroblastos NIH-3T3 incubados sin nanomateriales. Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio invertido.

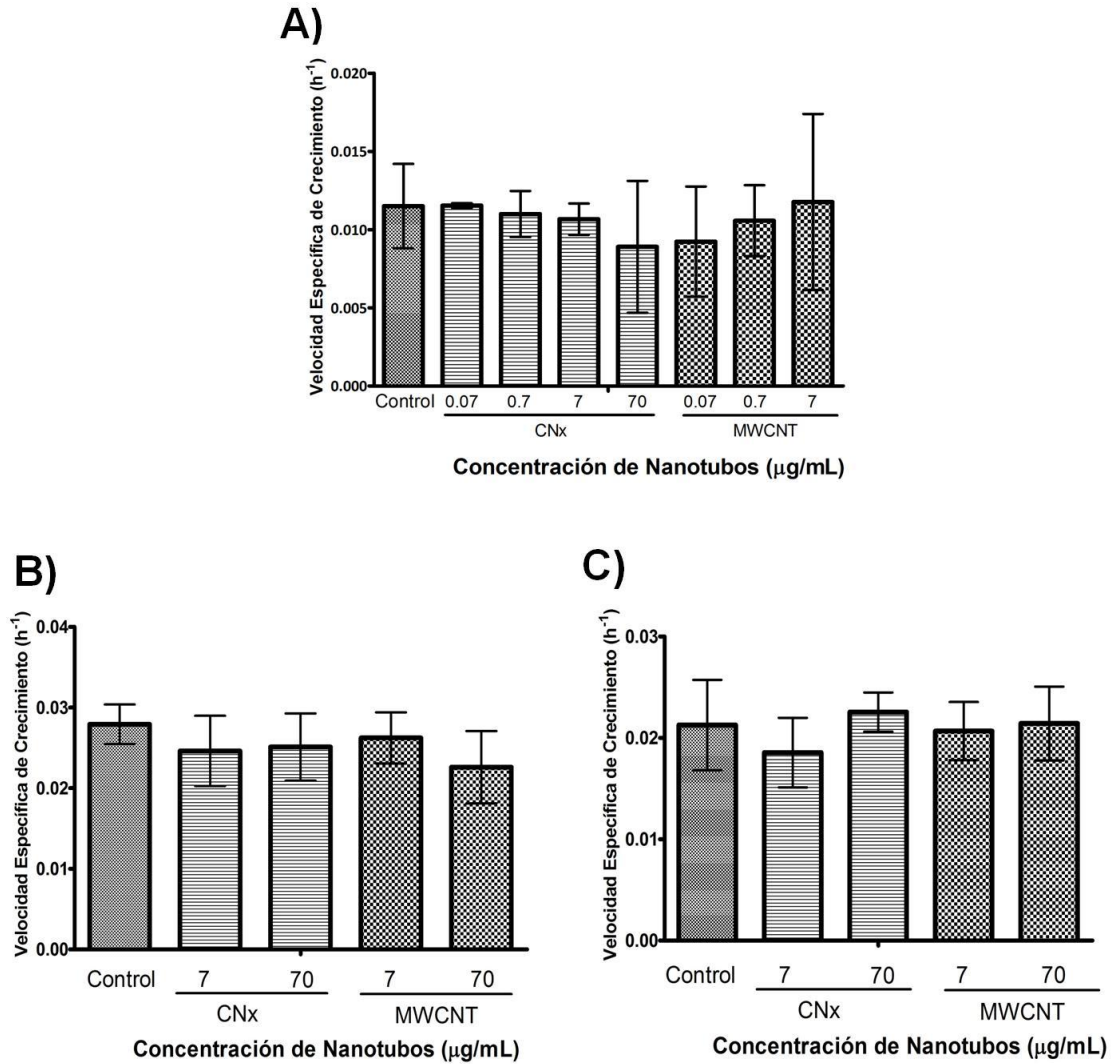


Figura 6. Velocidad específica de crecimientos de fibroblastos de ratón NIH-3T3.

Pendientes generadas a partir de curvas de crecimiento de fibroblastos incubados con nanotubos de carbono (CNx y MWCNT) a distintas concentraciones dispersos en medio de cultivo (A), etanol absoluto (B) y agua destilada (C), $n \leq 5$.

Después de 96 h de exposición de nanotubos (CNx o MWCNT, dispersos en medio de cultivo) con fibroblastos NIH-3T3 se encontró que el número de células disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando se usaron concentraciones superiores a 7 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT y 70 $\mu\text{g/mL}$ de CNx (Figura 7 A). Esta disminución en el número de fibroblastos también se observó cuando las células se incubaron con 70 $\mu\text{g/mL}$ de CNx o MWCNT dispersos en etanol absoluto (Figura 7 B). La cantidad de fibroblastos de ratón medida a las 96 h disminuyó significativamente cuando se incubaron con 7 $\mu\text{g/mL}$ de CNx dispersos en agua (Figura 7 C).

La disminución de la concentración celular es una manera directa de evaluar la biocompatibilidad/toxicidad de los CNTs, varias investigaciones han atribuido este efecto biológico al tipo de nanotubos, concentración y tiempo de exposición (Liu et al. 2010, Meng et al. 2009, Mooney et al. 2008, Sohaebuddin et al. 2010, Zhao et al. 2011). Los resultados sugieren que el ensayo de exposición también es un factor a considerar para evaluar el efecto tóxico de los CNTs en células de mamíferos.

3.4. Análisis del proteoma de fibroblastos de ratón expuestos a MWCNT y CNx

En la Figura 8 se muestra una imagen representativa de los geles 2D en condiciones desnaturizantes de las proteínas extraídas de los cultivos de fibroblastos de ratón expuestos durante 96 h a 7 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT o CNx dispersos en agua destilada. Actualmente se está trabajando en el análisis de las manchas mediante el software PDQuest para determinar las diferencias entre los perfiles proteómicos de fibroblastos control y los expuestos a CNTs.

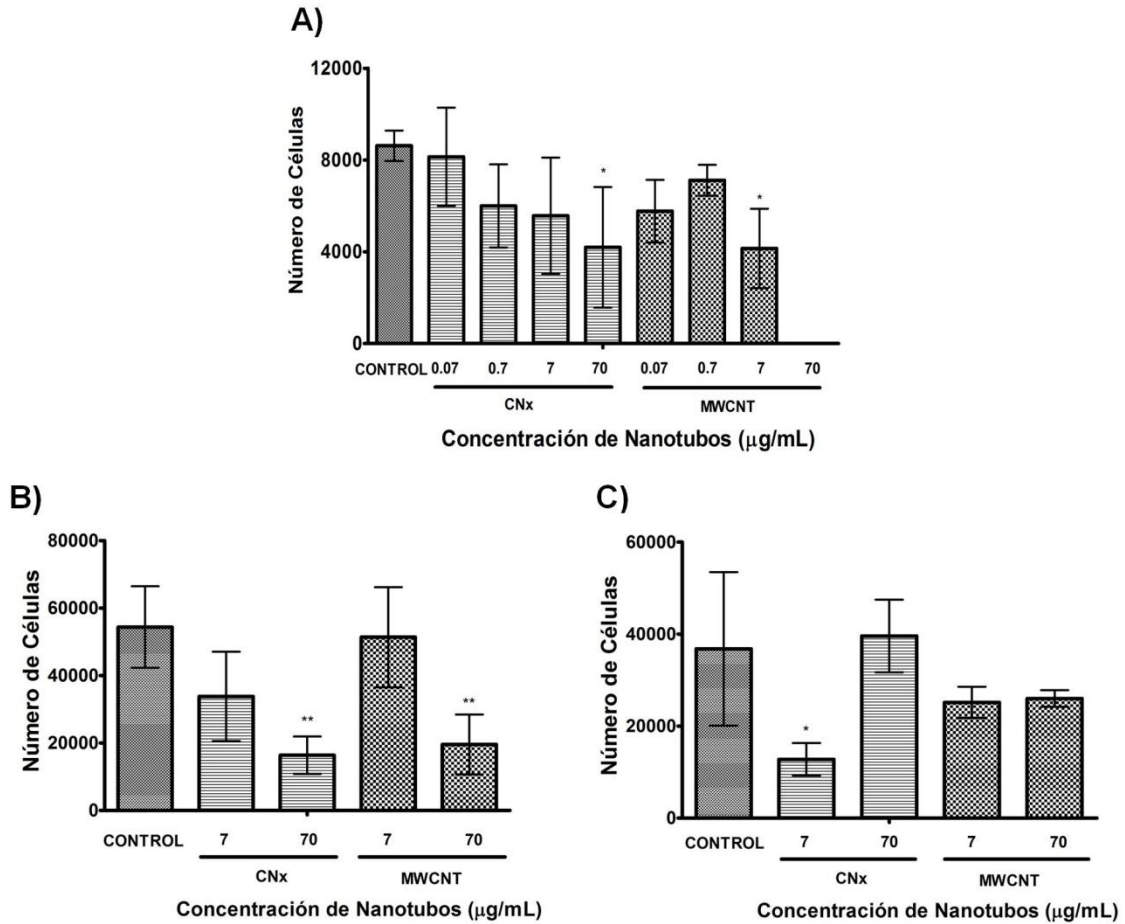


Figura 7. Concentración de fibroblastos de ratón NIH-3T3 a las 96 h de cultivo con nanotubos.

Los nanotubos de carbono (CNx y MWCNT) se dispersaron en medio de cultivo (A), etanol absoluto (B) y agua destilada (C), posteriormente se incubaron a una concentración final de 7 y 70 µg/mL con fibroblastos NIH-3T3. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n \leq 5$.

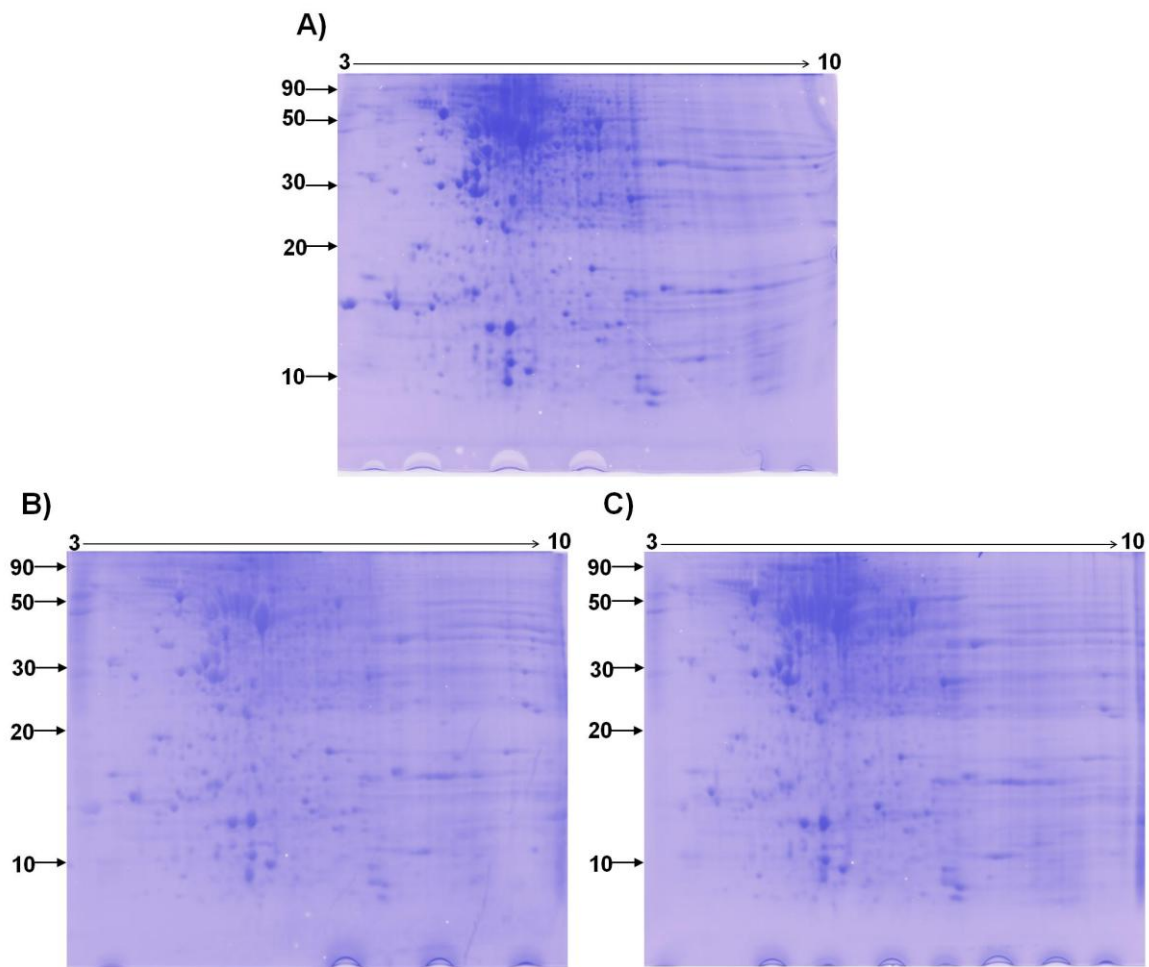


Figura 8. Imagen representativa de geles 2D de proteínas totales extraídas de cultivos fibroblastos de ratón expuestos a nanotubos de carbono.

Los fibroblastos de ratón se incubaron durante 96 h con 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNT (B) o CNx (C) dispersos en agua destilada. Como control se usaron fibroblastos no expuestos a nanotubos (A).

4. Conclusiones

1. Los CNx se dispersan de manera más estable que los MWCNT en distintas soluciones debido a los sitios nitrogenados que tienen en su estructura.
2. Los resultados muestran que los CNx son menos tóxicos para fibroblastos de ratón NIH-3T3 que los MWCNT cuando estos son incubados inmediatamente después de la disociación celular con tripsina.
3. El momento de aplicación de nanotubos a los cultivos celulares influye con la biocompatibilidad de estos sobre los fibroblastos de ratón NIH-3T3.

5. Referencias

- Alpatova AL, Shan W, Babica P, Upham BL, Rogensues AR, Masten SJ, Drown E, Mohanty AK, Alocilja EC, Tarabara VV. 2010. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: Effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions. *Water Research* 44: 505-520.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T. 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters* 160: 121-126.
- Buford MC, Hamilton RF, Holian A. 2007. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* 4: 6.
- Carrero-Sanchez JC, Elias AL, Mancilla R, Arrellin G, Terrones H, Laclette JP, Terrones M. 2006. Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett* 6: 1609-1616.
- Ciofani G, Danti S, D'Alessandro D, Moscato S, Menciassi A. 2010. Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: Interference with the MTT assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394: 405-411.
- Cui HF, Vashist SK, Al-Rubeaan K, Luong JH, Sheu FS. 2010. Interfacing carbon nanotubes with living mammalian cells and cytotoxicity issues. *Chem Res Toxicol* 23: 1131-1147.
- Chun K-Y, Choi SK, Kang HJ, Park CY, Lee CJ. 2006. Highly dispersed multi-walled carbon nanotubes in ethanol using potassium doping. *Carbon* 44: 1491-1495.
- Ferreira L, Karp JM, Nobre L, Langer R. 2008. New Opportunities: The Use of Nanotechnologies to Manipulate and Track Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3: 136-146.
- Haniu H, Matsuda Y, Takeuchi K, Kim YA, Hayashi T, Endo M. 2010. Proteomics-based safety evaluation of multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242: 256-262.
- Haniu H, et al. 2011. Effect of dispersants of multi-walled carbon nanotubes on cellular uptake and biological responses. *International Journal of Nanomedicine*: 3295.
- Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF, Dahl KN. 2010. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. *ACS Nano* 4: 4872-4878.
- Iijima S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56-58.
- Kamalakaran R, Terrones M, Seeger T, Kohler-Redlich P, Rühle M, Kim YA, Hayashi T, Endo M. 2000. Synthesis of thick and crystalline nanotube arrays by spray pyrolysis. *Applied Physics Letters* 77: 3385-3387.
- Kim JH, et al. 2011. Unusually High Dispersion of Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes in DNA Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* 115: 14295-14300.
- Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. 2011. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility,

- biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810: 361-373.
- Liu D, Yi C, Zhang D, Zhang J, Yang M. 2010. Inhibition of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated carbon nanotubes. *ACS Nano* 4: 2185-2195.
- Luche S, Santoni V, Rabilloud T. 2003. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3: 249–253.
- Marsh DH, Rance GA, Zaka MH, Whitby RJ, Khlobystov AN. 2007. Comparison of the stability of multiwalled carbon nanotube dispersions in water. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9: 5490.
- Meng J, Yang M, Song L, Kong H, Wang CY, Wang R, Wang C, Xie SS, Xu HY. 2009. Concentration control of carbon nanotubes in aqueous solution and its influence on the growth behavior of fibroblasts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71: 148-153.
- Mooney E, Dockery P, Greiser U, Murphy M, Barron V. 2008. Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation. *Nano Lett* 8: 2137-2143.
- Nam C-W, Kang S-J, Kang YK, Kwak M-K. 2011. Cell growth inhibition and apoptosis by SDS-solubilized single-walled carbon nanotubes in normal rat kidney epithelial cells. *Archives of Pharmacal Research* 34: 661-669.
- Nayak TR, Jian L, Phua LC, Ho HK, Ren Y, Pastorin G. 2010. Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation. *ACS Nano* 4: 7717-7725.
- Pacurari M, Qian Y, Fu W, Schwegler-Berry D, Ding M, Castranova V, Guo NL. 2012. Cell Permeability, Migration, and Reactive Oxygen Species Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Human Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 75: 112-128.
- Qi R, Shen M, Cao X, Guo R, Tian X, Yu J, Shi X. 2011. Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials. *The Analyst* 136: 2897.
- Rafeeqi T, Kaul G. 2011. Elucidation of Interaction Between Multi-Walled Carbon Nanotubes and Cell Culture Medium by Spectroscopy Supports Biocompatibility of These Nanotubes. *Advanced Science Letters* 4: 536-540.
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology* 7: 22.
- Wang X, et al. 2012. Pluronic F108 Coating Decreases the Lung Fibrosis Potential of Multiwall Carbon Nanotubes by Reducing Lysosomal Injury. *Nano Letters*: 120504154354001.
- Witzmann F, Monteiroviere N. 2006. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2: 158-168.
- Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. 2006. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 6: 1261-1268.
- Xing Y, Li L, Chusuei CC, Hull RV. 2005. Sonochemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Langmuir* 21: 4185-4190.

- Yang Y, Xu Z-H, Pan Z, Li X. 2012. Hydrogen Passivation Induced Dispersion of Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials* 24: 881-885.
- Yuan J, Gao H, Ching CB. 2011. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicology Letters* 207: 213-221.
- Zhao ML, Li DJ, Yuan L, Yue YC, Liu H, Sun X. 2011. Differences in cytocompatibility and hemocompatibility between carbon nanotubes and nitrogen-doped carbon nanotubes. *Carbon* 49: 3125-3133.

Anexos

Perspectivas

- Análisis de proteínas diferenciales obtenidas de fibroblastos de ratón NIH-3T3 incubadas con CNx o MWCNT a una concentración final de 7 µg/mL mediante espectrometría de masas (MS/MS).
- Estudios de dispersión de nanotubos mediante espectrofotometría UV-Vis.
- Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células expuestas a nanotubos de carbono (CNx y MWCNT).
- Formación y caracterización de matrices de CNx y MWCNT y composites (polímeros-nanotubos de carbono).
- Evaluación de la biocompatibilidad de nanotubos de carbono con otras líneas celulares de mamíferos (osteosarcoma, células troncales).
- Interacción de nanotubos de carbono (dispersos y en matrices) con células animales mediante SEM.