

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

“Citotoxicidad inducida por nano-estructuras de carbono tipo esponjas en un modelo de Glioblastoma”

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

Aleli Janet Salazar Ramiro

Codirectores

Dra. Anabel Jiménez Anguiano  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Benjamín Pineda Olvera  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.  
Manuel Velasco Suárez

Asesora

Dra. Verónica Pérez de la Cruz  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.  
Manuel Velasco Suárez

Octubre/2021

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”.

## Declaración de originalidad

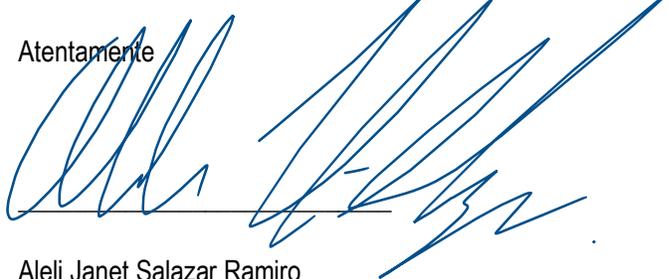
El (La) que suscribe Aleli Janet Salazar Ramiro alumna del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Citotoxicidad inducida por nano-estructuras de carbono tipo esponjas en un modelo de Glioblastoma",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el Posgrado de Biología Experimental para lo obtención del grado de Doctora en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 2 de febrero del 2022.

Atentamente



Aleli Janet Salazar Ramiro

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*

## Resumen

El glioblastoma es el tumor cerebral más agresivo con una media de supervivencia de 14 meses. El único tratamiento aprobado por la FDA para la liberación tópica de la carmustina es el Gliadel. Sin embargo; su uso ha sido asociado con efectos adversos severos, principalmente provocados por un efecto de masa. Las esponjas de carbono dopadas con nitrógeno (N-CNSs) son un nuevo tipo de nanomaterial que exhiben alta biocompatibilidad, y son capaces de cargar grandes cantidades de drogas hidrofóbicas, reduciendo la cantidad del acarreador. Este estudio evaluó el uso de N-CNSs como un potencial acarreador de carmustina utilizando líneas celulares de glioma maligno. Las N-CNSs fueron caracterizadas por un análisis de rastreo de nanopartículas y microscopía electrónica de transmisión. La biocompatibilidad de las N-CNSs fue determinada en células de glioma y astrocitos primarios. Posteriormente, las N-CNSs fueron cargadas con carmustina (relación 1:10 peso/peso) y se determinaron la eficiencia de la droga y de liberación, así como la inducción de citotoxicidad. Las N-CNSs presentaron una distribución de tamaño homogénea formada por nanotubos, sin inducir citotoxicidad a concentraciones por debajo de los 40 µg/mL. Las N-CNSs cargadas con carmustina exhibieron una cinética de liberación de carmustina continua con una liberación máxima a las 72 h. El efecto citotóxico de las N-CNSs cargadas con carmustina fue similar al de la carmustina sola. Los resultados demostraron que las N-CNSs son nanoestructuras biocompatibles que podrían ser usadas como acarreadores para el transporte de grandes cantidades de agentes quimioterapéuticos.

## **Abstract**

Glioblastoma is the most aggressive brain tumor with a low median survival of 14 months. The only Food and Drug Administration (FDA)-approved treatment for topical delivery of the cancer drug carmustine is Gliadel. However, its use has been associated with several side-effects, mainly induced by a mass effect. Nitrogen-doped carbon nanotube sponges (N-CNSs) are a new type of nanomaterial exhibiting high biocompatibility, and they are able to load large amounts of hydrophobic drugs, reducing the amount of carriers. This study evaluated the use of N-CNSs as potential carmustine carriers using malignant glioma cell lines. N-CNSs were characterized by nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy. The biocompatibility of N-CNSs was determined in glioma cell lines and in primary astrocytes. Afterwards, N-CNSs were loaded with carmustine (1:10 w/w), and there were determined the drug and liberation efficiency, as well as cytotoxicity induction. N-CNSs presented a homogeneous size distribution formed by round nanotubes, without induced cytotoxicity, at concentrations below 40  $\mu\text{g/mL}$ . The N-CNSs loaded with carmustine showed a continuous kinetic release of carmustine with a maximum release after 72 h. The cytotoxic effect of N-CNSs loaded with carmustine was similar to that of carmustine alone. The results demonstrated that N-CNSs are a biocompatible nanostructure that could be used as carriers for the tumoral load of large amounts of chemotherapeutic agents.

## Índice general

Resumen .....	3
Abstract.....	4
1. Introducción .....	6
2.1 Astrocitomas.....	7
2.2 Glioblastoma Multiforme .....	8
2.3 Tratamiento y nuevos abordajes terapéuticos.....	10
2.4 Nuevos enfoques terapéuticos .....	12
2.5 Nanotubos de carbono .....	14
2. Justificación .....	16
3. Hipótesis .....	16
4. Objetivo general.....	17
5. Objetivos particulares .....	17
6. Materiales y métodos.....	17
6.1 Materiales .....	17
6.2 Métodos .....	18
7. Resultados .....	25
8. Discusión .....	35
9. Conclusiones.....	40
10. Referencias .....	41
11. Anexos.....	56
Anexo 1. Técnica de evaporación de disolvente para la carga de N-CNSs con BiCNU. ....	56
Anexo 2: Procedimiento para la siembra de placas de 96 pozos .....	57
12. Figuras suplementarias .....	60

## 1. Introducción

Los tumores malignos del sistema nervioso central (SNC) son un grupo de neoplasias heterogéneas que se generan en cerebro y/o médula espinal; actualmente, comprenden del 15 al 20 % de todas las neoplasias en infancia y adolescencia<sup>1</sup>. Su incidencia a nivel mundial es de 23 por cada 100,000 habitantes, siendo la primera causa de muerte por cáncer en niños y la segunda causa de muerte por cáncer en adultos jóvenes<sup>2, 3</sup>. La etiología de los tumores cerebrales aún no está completamente dilucidada; hasta la fecha, la radiación ionizante es el único factor de riesgo que está completamente probado como causante de tumores del SNC<sup>4</sup>; sin embargo, existen otros factores de riesgo asociados a su aparición como lo son el abuso del alcohol, exposición a solventes o pesticidas, exposición a campos electromagnéticos entre otros<sup>5, 6</sup>. Los síntomas dependen del grado de crecimiento y ubicación del tumor pero, de manera general, se presentan como dolores de cabeza, mareos, visión borrosa, problemas de equilibrio, cambios en la personalidad e incluso convulsiones<sup>3</sup>. Hasta la fecha el pronóstico para pacientes con esta clase de tumores es muy desfavorable; solo el 35.8 % de los pacientes diagnosticados tienen una sobrevida mayor a 5 años; lo que ocasiona 79,000 muertes al año, solo en Estados Unidos<sup>7</sup>.

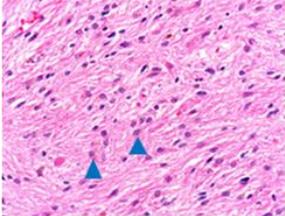
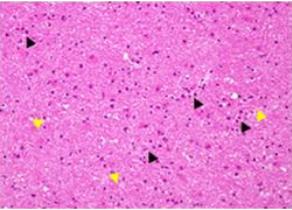
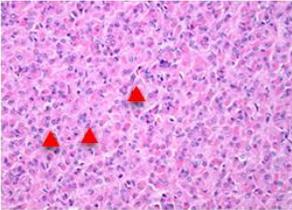
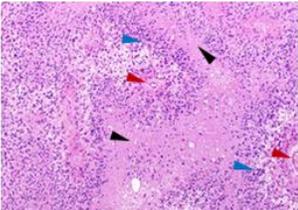
De todos los posibles tumores que pueden aparecer en el cerebro o médula espinal, los astrocitomas, son los tumores más frecuentes, agresivos y los de mayor mortalidad en todo el SNC.

## **Antecedentes**

### **2.1 Astrocitomas**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas basándose en el sistema de St. Anne-Mayo para diagnóstico histológico <sup>8</sup>. Actualmente, se definen 4 categorías de astrocitomas de acuerdo con sus alteraciones histológicas, como el grado de diferenciación, presencia de necrosis, pleomorfismo y atíпия nuclear, presencia de cuerpos mitóticos y proliferación vascular (Tabla 1).

- Grado I. Astrocitoma pilocítico: tumor considerado benigno, de lento crecimiento y que usualmente es asociado a una mayor sobrevida debido a que tiene un bajo potencial para convertirse a un tumor de mayor malignidad.
- Grado II. Astrocitoma difuso: Tumor que presenta una hiper celularidad incrementada en comparación al grado I, aunque sin evidencia de mitosis, necrosis o vascularización. Estos tumores se caracterizan por tener un borde difuso, aunque sigue presentando un lento crecimiento; sin embargo, este estadio es capaz de convertirse a tumores de mayor malignidad.
- Grado III. Astrocitoma Anaplásico: tumor infiltrante con un porcentaje alto de hiper celularidad y mayor número de mitosis, aunque sin proliferación vascular o necrosis. Tiene una alta tasa de recurrencia.
- Grado IV. Glioblastoma Multiforme (GBM): Tumor con alto grado de hiper celularidad y alto porcentaje de mitosis. Existe alta presencia de proliferación vascular y necrosis. Además, de los cuatro tipos de astrocitomas, el GBM, es el tumor más frecuente y agresivo del SNC.

Clasificación de astrocitomas por la OMS			
Nombre	Histología	Características	Sobrevida (Años)
Grado I. Astrocitoma pilocítico		Glioma considerado benigno. Usualmente asociado a una mayor sobrevida. Presencia de atipia y pleomorfismo nuclear (flecha azul). Bajo grado de hiper celularidad.	>10
Grado II. Astrocitoma Difuso		Incremento leve a moderado de la celularidad (flecha negra), Pleomorfismo y atipia nuclear variable. Aspecto fibrilar por prolongaciones astrocíticas (flecha amarilla)	10
Grado III. Astrocitoma Anaplásico		Pérdida de la arquitectura normal del tejido nervioso. Presencia de cuerpos mitóticos (flecha roja), aunque sin proliferación vascular o necrosis. El tumor una alta tasa de recurrencia.	5
Grado IV. Glioblastoma Multiforme		Necrosis con patrón serpiginoso (flecha negra). Células en pseudoempalizada (Flecha roja). Neoangiogénesis (flecha roja).	1

Imágenes tomadas de Hayat M.A., Tumors of the Central Nervous System, Volume 8, Springer, 2012. Imágenes obtenidas de la página <http://www.webpathology.com/>, consultada el 14 de mayo de 2021.

## 2.2 Glioblastoma Multiforme

El GBM es un tumor que se caracteriza principalmente por adquirir formas aberrantes, atipia nuclear, pleomorfismo celular, necrosis y angiogénesis<sup>9</sup>. El GBM es más común en población caucásica en relación con otras razas<sup>10</sup>, ocurre más

frecuentemente en hombres que en mujeres <sup>10</sup> y su incidencia aumenta con la edad, siendo los 64 años la edad promedio de diagnóstico <sup>11</sup>. Las manifestaciones clínicas son dependientes de la zona de aparición y el tamaño del tumor; estas pueden incluir déficits focales neurológicos, estatus mental alterado, convulsiones, debilidad persistente en miembros inferiores y superiores, pérdida de visión, pérdida del lenguaje, cambios en la personalidad y dolores de cabeza <sup>12</sup>.

Entre 2013 y 2017, el Registro de Tumores del SNC de los Estados Unidos (CBTRUS) reportó que el GBM representaba el 48.6 % de todos los astrocitomas, convirtiéndose en la neoplasia maligna más común del SNC <sup>11</sup>. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, representa el 55.5 % de astrocitomas tratados en este instituto <sup>13</sup>.

De acuerdo con el curso clínico y su expresión genética, los GBM son subclasificados en primarios (cuando aparecen *de novo*) y secundarios (progresión maligna de un astrocitoma de bajo grado hasta uno alto grado) <sup>14</sup>. Aunque ambos tipos tienen una naturaleza heterogénea, los GBM primarios se caracterizan principalmente por la amplificación / sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y mutación de gen homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN) y pérdida del cromosoma 10. Los GBM secundarios, pueden desarrollarse a través de la transformación de un astrocitoma de un grado inferior y son producto de la acumulación de diversas mutaciones que incluye alteraciones en el gen p53, PTEN, en el inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina 2/p16/p14 (CDK2A/p16/p14), cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), proteína del retinoblastoma (RB) y en protooncogenes como EGFR, factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGFR) <sup>15</sup>, subunidad catalítica alfa fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PIK3CA) y el oncogen Kras (KRAS) <sup>16</sup>.

### **2.3 Tratamiento y nuevos abordajes terapéuticos**

A partir de la primera descripción hecha por Rudolf Virchow en 1865 <sup>17</sup>, la forma de tratar el GBM ha ido cambiando y actualizándose, en un intento de aumentar la supervivencia de los pacientes <sup>18, 19</sup> (**Figura 1**). El tratamiento requiere un abordaje multidisciplinario que incluye cirugía, máxima resección posible, seguida de radioterapia y quimioterapia adyuvante <sup>18</sup>. Siendo el uso de agentes quimioterapéuticos una de las piedras angulares de este tratamiento multimodal <sup>20</sup>, la FDA ha aprobado diversos fármacos para su uso contra GBM, entre los que se encuentran:

- Cisplatino (MF-Cl<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Pt;): también llamado cis-diaminedicloroplatino (II), es un compuesto de coordinación metálico y se ha utilizado contra carcinomas, tumores de células germinales, linfomas y sarcomas <sup>21</sup>. Su mecanismo de acción consiste en la unión de bases púricas causando daño al DNA, ya que interfiere con los mecanismos de reparación, lo que finalmente induce apoptosis <sup>22</sup>. Sin embargo, el cisplatino se une aproximadamente en un 90 % a las proteínas, lo que provoca que solo un pequeño porcentaje del fármaco llegue al sitio del tumor <sup>23</sup>. Debido a los efectos secundarios que incluyen neurotoxicidad y nefrotoxicidad, este fármaco dejó de ser considerado como el quimioterapéutico de primera elección para el tratamiento de GBM.

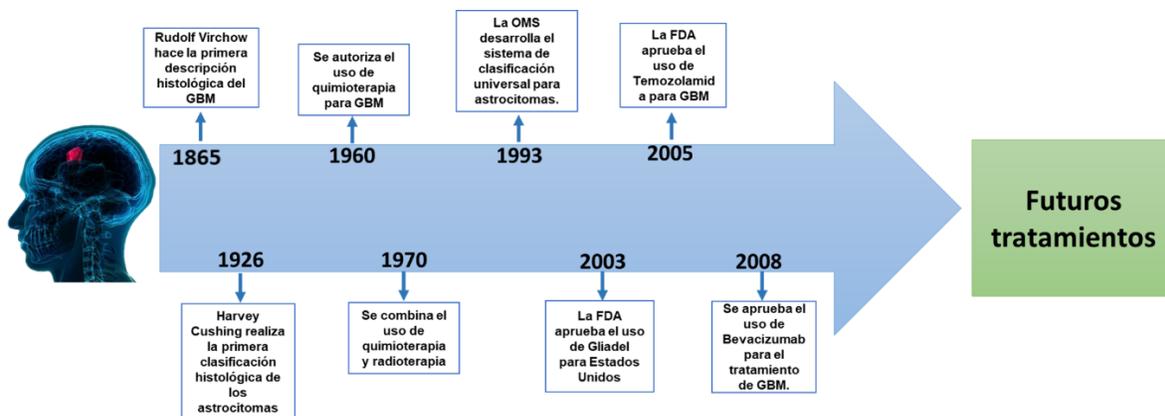
- Carboplatino: Fármaco a base de platino que se utiliza para neoplasias sólidas. El mecanismo del carboplatino es similar al del cisplatino, que se une covalentemente

al ADN para formar aductos de platino. Los efectos adversos por el uso de este quimioterapéutico incluyen náuseas, vómito, mielosupresión y trombocitopenia.

- Temozolamida (TMZ): Agente alquilante que es administrado por vía oral, previniendo la proliferación de células tumorales <sup>24</sup>. Stupp y colaboradores demostraron la eficacia y toxicidad de la TMZ, convirtiéndose en el régimen estándar en la quimioterapia contra neoplasias del SNC <sup>25</sup>. Desde 2006, su uso ha sido aprobado para el tratamiento estándar del GBM junto con radioterapia y cirugía. Aunque se demostró que la TMZ es eficaz para aumentar la supervivencia de los pacientes, la toxicidad de la TMZ tiene el potencial de afectar negativamente la calidad de vida del paciente.

- Carmustina (1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosourea o BiCNU), es un agente alquilante de la familia de las nitrosoureas que se utiliza para el tratamiento de tumores malignos. Este fármaco actúa principalmente alquilando el ADN y ARN <sup>26</sup>, un fármaco altamente lipofílico, altamente soluble en soluciones como Dimetil Sulfoxido (DMSO) o etanol, (hasta 150 mg/mL en etanol 50 %) <sup>27</sup>; además, gracias a su naturaleza altamente lipofílica, puede ingresar en altas concentraciones al SNC. Cuando fue aprobado por la FDA en 1977, el uso de BiCNU en pacientes con GBM aumentó la supervivencia 3 meses en comparación al régimen terapéutico previamente utilizado <sup>28</sup>; sin embargo, la administración sistémica de BiCNU provocó efectos adversos que iban desde fiebre, mareos, hemorragias, fatiga extrema, eritema facial, anemia, disminución de la presión arterial hasta toxicidad pulmonar <sup>26</sup>. Debido a estos efectos adversos provocados por su administración sistémica, se diseñó un polímero cargado con carmustina, conocido como Gliadel para la administración

local del quimioterapéutico <sup>1</sup>. Los estudios en animales han demostrado que la administración local ofrece hasta 1000 veces más fármaco en el sitio del tumor que a través de la administración intravenosa <sup>29</sup>. A pesar de que el Gliadel representa una forma farmacéutica efectiva para evitar los efectos adversos producidos por la administración sistémica de la carmustina, el polímero empleado para el transporte y liberación del fármaco no tiene gran capacidad de carga, lo que causa efectos secundarios adversos derivados del efecto de masa que produce de manera local.



**Figura 1.** Evolución histórica de la descripción y tratamientos usados para el GBM.

## 2.4 Nuevos enfoques terapéuticos

Debido a la falta de respuesta al tratamiento por parte del GBM, se han evaluado nuevas alternativas terapéuticas para este tipo de neoplasias. Como se mencionó anteriormente, en los últimos años, se propuso la liberación *in situ* de quimioterapéuticos en el lecho tumoral. En el año 2011, la FDA aprobó el uso del Gliadel para el tratamiento de Glioblastoma. El Gliadel es un polímero biodegradable compuesto por polifeprosan más ácido sebaico <sup>30</sup>. Cada oblea tiene un peso de 192 mg y solo el 3.85 % de ese peso corresponde a Carmustina <sup>30</sup>. Este implante es colocado en el lecho quirúrgico después de la resección tumoral, liberando el

quimioterapéutico cuando el polímero va degradándose en el medio acuoso. Después de 4 a 6 semanas el polímero se degrada completamente <sup>31</sup>. El uso de Gliadel ha demostrado tener un impacto positivo en la supervivencia media de los pacientes; en 2011, Chaichana y colaboradores demostraron que los pacientes tratados con el tratamiento estándar más Gliadel tuvieron un aumento en la supervivencia media de 3 meses en comparación con los pacientes que sólo recibieron el tratamiento estándar <sup>32</sup>. Sin embargo, estudios posteriores también demostraron que el uso de Gliadel estaba relacionado con la aparición de efectos adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. En el año de 2017, Garside y colaboradores reportaron que el 50 % de los pacientes que recibieron Gliadel mostraron la aparición de edema, aumento en la presión intracraneal y convulsiones; además de pérdida de movimientos de miembros inferiores y superiores <sup>33</sup>. Estos efectos adversos fueron producto de la presión constante que el polímero ejerce en zonas adyacentes a la resección tumoral, generando un aumento de la presión intracraneal y efecto de masa. Si bien, el 80% de los pacientes dejaron de padecer estos efectos cuando se degradó el polímero, en el 20 % de ellos, los efectos fueron crónicos debido al daño permanente del tejido circundante <sup>33</sup>. Por esta razón, es necesario encontrar un nuevo material que funcione como vehículo de liberación de agentes quimioterapéuticos para que se puedan liberar de manera eficaz, sin producir los efectos adversos previamente mencionados.

## 2.5 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (NTC) son hojas de grafeno enrolladas de una manera cilíndrica, sintetizados en el año de 1991 por Sumio Iijima, quien describió este material como “estructuras tubulares compuestas de carbono en forma de aguja que se encuentran en el rango de los nanómetros”<sup>34</sup>. Estructuralmente, los NTC consisten en una red carbono-carbono con hibridación  $sp^2$ , en la cual cada átomo de carbono se encuentra covalentemente unido entre sí<sup>35</sup>. Hoy en día, los NTC han sido ampliamente utilizados en diferentes campos como biotecnología, biorremediación<sup>36</sup> y particularmente en el campo de la biomedicina, donde han sido usados como transportadores de múltiples agentes quimioterapéuticos<sup>37</sup>.

Además de esto, después de ser sintetizados, los NTC pasan por un proceso conocido como funcionalización, que es la adición de grupos funcionales como  $-NH_2$  o  $-NH_3$  a la superficie de los CNTs por medio de baños de ácido nítrico o ácido sulfúrico<sup>38, 39</sup>. Este proceso aumenta su biocompatibilidad, lo cual les permite transitar libremente a través de la circulación sanguínea y atravesar diferentes barreras fisiológicas, como la barrera hemato-encefálica (BHE), ocasionando daños mínimos al tejido sano<sup>40-42</sup>.

Otro aspecto para considerar en el uso de NTC como transportadores de fármacos, es la capacidad de internalización celular, ya que esta puede determinar la especificidad o el efecto que los NTC pueden ejercer sobre las células<sup>43</sup>. Diversas investigaciones han demostrado que los mecanismos de internalización celular están directamente relacionados con el tamaño y tipo de molécula que se está transportando; mientras que NTC > 400 nm con proteínas ligadas a su superficie

son internalizadas por endocitosis, nanotubos menores a 400 nm de longitud son endocitadas por las células mediante un proceso de difusión <sup>44, 45</sup>; el uso de nanoestructuras en este rangos de tamaño aumentarían la internalización celular, lo cual incrementaría la cantidad de fármaco liberado directamente a tumores sólidos <sup>46</sup>.

Debido a estas razones, se ha propuesto el uso de nanoestructuras de carbono para el acarreamiento de quimioterapéuticos al sitio tumoral. En este sentido, gracias a sus características fisicoquímicas, las esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno (N-CNSs, por sus siglas en inglés) han demostrado tener potencial para actuar como tal. Las N-CNSs son estructuras compuestas de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) dopados con nitrógeno que tienen características superhidrofóbicas, lipofílicas y de gran capacidad de carga, siendo capaces de cargar hasta 100 veces su peso <sup>47</sup>. Debido a estas características, las N-CNSs pueden servir para ser cargados con quimioterapéuticos y ser liberadas en el lecho tumoral, lo cual evitaría la toxicidad sistémica del quimioterapéutico e induciría toxicidad sobre células tumorales directamente. Estas nanoestructuras pueden ser usadas principalmente contra tumores sólidos en los cuales los efectos adversos ocasionados por el agente quimioterapéutico reducen significativamente la calidad de vida de los pacientes <sup>48-51</sup>. Además, diversos estudios han demostrado la biocompatibilidad de estas estructuras de carbono; en 2004, Correa y colaboradores probaron que los nanotubos de carbono tipo esponja permitían una mayor proliferación de fibroblastos cuando eran colocados como andamiaje para crecimiento celular <sup>52</sup>. Actualmente, debido a esta alta biocompatibilidad, también

se han utilizado como estructuras de andamiaje para la regeneración nerviosa <sup>53</sup> y el crecimiento de tejido óseo <sup>54</sup>.

Debido a las razones mencionadas previamente, en este trabajo evaluamos los N-CNSs, previamente sintetizados [8], como un posible acarreador de BiCNU. La morfología, el tamaño, perfil de liberación y la toxicidad inducida por las N-CNSs y por las N-CNSs cargadas con BiCNU se caracterizaron en diversas líneas celulares de glioma maligno y en un cultivo celular primario de astrocitos, al ser los astrocitos la contraparte sana de las células mutadas de GBM.

## **2. Justificación**

El tratamiento estándar actual para el GBM es solo paliativo. Si bien el uso de Gliadel aumenta la supervivencia hasta 3 meses comparado con el tratamiento de primera elección actual, los efectos adversos inducidos por el transportador del fármaco disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos vehículos con gran capacidad de carga para la liberación de carmustina *in situ* que generen menos efectos adversos que los utilizados actualmente.

## **3. Hipótesis**

Si las esponjas de carbono tienen una alta capacidad de carga de fármaco y son biocompatibles, entonces cargarán grandes cantidades de carmustina, la cual será liberada paulatinamente e inducirá citotoxicidad en células tumorales de GBM.

#### **4. Objetivo general**

Determinar el efecto de las esponjas de carbono cargadas con carmustina sobre células tumorales en un modelo *in vitro* de GBM.

#### **5. Objetivos particulares**

- Caracterizar la forma, tamaño y estructura de las N-CNSs.
- Determinar el efecto de las N-CNSs sobre la viabilidad celular en las líneas de GBM humano U87, las líneas de glioma maligno de rata C6 y RG2 y sobre su contraparte sana, los astrocitos.
- Determinar el perfil de liberación de BiCNU de las N-CNSs en medio de cultivo celular y líquido cefalorraquídeo artificial.
- Determinar el efecto de la carmustina liberada por las N-CNSs sobre la línea celular de glioma maligno RG2

#### **6. Materiales y métodos**

##### **6.1 Materiales**

El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) se obtuvo de GIBCO Invitrogen. El medio DMEM se adicionó con penicilina, estreptomina y Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y carmustina (bis-cloroetilnitrosourea, BiCNU) fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La carmustina utilizada en los ensayos se disolvió en etanol 100 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.). Los MWCNT que forman a las N-CNSs se fabricaron mediante la pirólisis de una solución de ferroceno ( $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ ) y bencilamina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) mediante la técnica de depósito químico de vapor

asistido por aerosol (ACVD) utilizando dos diferentes rociadores (instrumentación RBI), como ha sido reportado en trabajos previos <sup>47</sup>.

## **6.2 Métodos**

### *6.2.1 Caracterización de esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)*

La distribución de tamaño de los N-CNSs se determinó mediante el instrumento Malvern Zetasizer NS300 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido), equipo que es capaz de medir tanto la dispersión de luz como el movimiento browniano de nanopartículas para obtener su distribución de tamaño en una suspensión líquida. Se realizaron 5 diferentes concentraciones de N-CNSs (10, 50, 100, 250 y 500 µg/mL) en buffer fosfato salino (PBS) para llegar a un valor ideal de 20-100 partículas por cuadro, utilizando finalmente la concentración de 10 µg/mL. Posteriormente, 100 µL de la muestra de N-CNSs se colocaron en el equipo, que cuenta con un láser azul (488 nm) y semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), lo cual permitió un análisis automático de la distribución de tamaño de todas las nanopartículas que se encuentran en un rango de tamaño de 10 a 2000 nm de diámetro. Las muestras se midieron por quintuplicado durante 10 seg de acuerdo con las especificaciones del equipo (temperatura: 21.2-21.4°C y un rango de 0.968-0.971 unidades de viscosidad [centipois] en agua). El software utilizado para la captura y análisis de datos fue NTA 3.2 Dev Build 3.2.16.

### *6.2.2 Caracterización de esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).*

La morfología de los N-CNSs fue observada utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) (FEI Tecnai G220 S-Twin, Hillsboro, OR, USA). Una gota de la suspensión de N-CNSs fue depositada en una rejilla de carbono revestida de cobre cargada con 5  $\mu$ L de agua Milli -Q, las cuales se secaron para mejorar el contraste con 1.5 % de uranil acetato. Las imágenes se adquirieron usando una cámara 4K Gatan OneView montada a un microscopio electrónico de transmisión Jem-2100 Plus (Jeol, Tokio, Japón) operando a 200 kV. Las muestras fueron analizadas con el software ImageJ (NIH).

### *6.3 Evaluación de la internalización celular de esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno.*

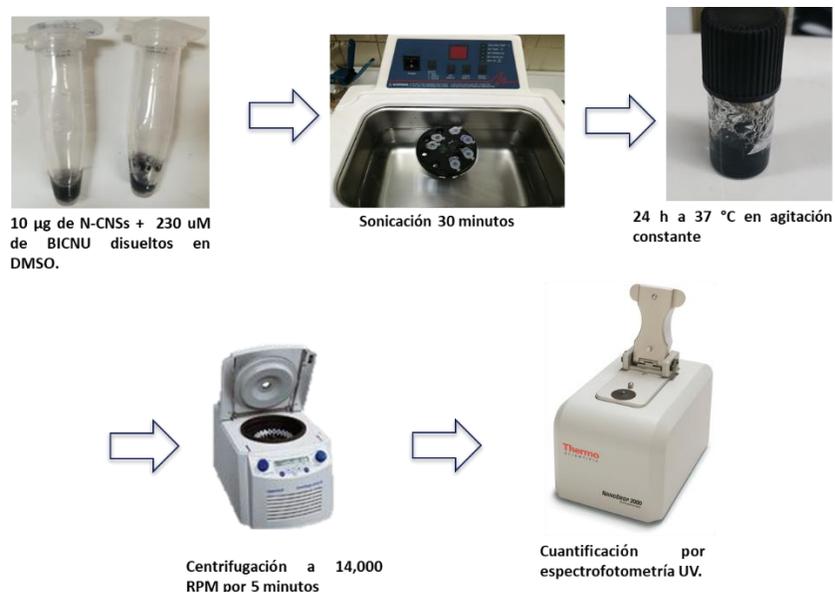
Para estimar la internalización de N-CNSs, se sembraron  $1 \times 10^5$  de células C6, RG2 y U87 de glioma y astrocitos en placas de 24 pozos que fueron mantenidas con medio DMEM suplementado con SFB. 24 h después, las células se trataron con diferentes concentraciones de N-CNSs (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL) durante 48 h. Después del tiempo de tratamiento, las células se colectaron utilizando 100  $\mu$ L de tripsina-EDTA y, se lavaron con 1 mL de PBS y fueron centrifugadas a 425xg para retirar los restos de medio DMEM o tripsina-EDTA. Al final, las células se resuspendieron en 350  $\mu$ L de PBS para realizar el análisis de citometría de flujo, donde se adquirieron 10,000 eventos totales usando el software CELLQUEST Pro. Posteriormente se utilizó el software Flow Jo V.10 para analizar los datos obtenidos del canal SSC (Side scatter channel) que refleja la dispersión lateral de la luz,

estimando la granularidad celular; así, se comparó la media de granularidad de cada muestra en relación con las células no tratadas. Los resultados se representaron como media  $\pm$  Desviación estándar (DE) de tres experimentos diferentes por triplicado.

#### *6.4 Carga y liberación de carmustina en esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno.*

##### *6.4.1 Carga de las N-CNSs mediante sonicación y agitación constante*

Para conseguir la carga más eficiente de las N-CNSs con BiCNU, se utilizaron varios métodos previamente descritos en la literatura <sup>55-57</sup>. El primer método consistió en sonicar 10  $\mu$ g de N-CNSs durante 30 min con 230  $\mu$ M de BICNU disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>), solvente orgánico incoloro que funciona como disolvente para BiCNU. Esta solución se mantuvo en agitación constante durante 24 h. Al final, las N-CNSs se centrifugaron a 11000xg (**Figura 2**) y se retiró el sobrenadante que no fue absorbido por las nanoesponjas. Debido a la cantidad del fármaco y N-CNSs disponibles, los estudios de liberación del fármaco se realizaron a pequeña escala con un volumen máximo de 100  $\mu$ L. Las N-CNSs cargadas con BICNU permanecieron a -20°C para estudios posteriores de liberación.



**Figura 2.** Imagen representativa de la carga de las N-CNSs por el método de sonicación.

#### 6.4.1.1 *Eficiencia de liberación de carmustina de las N-CNSs cargadas por el método de sonicación y agitación constante.*

Para el estudio de liberación del fármaco en medio DMEM, 10 µg de N-CNSs cargadas con BiCNU se colocaron en 100 µL de medio DMEM en tubos Eppendorf de 1.5 mL con porcentajes ascendentes de DMSO (del 1 al 10%), para observar si una mayor cantidad del disolvente en el medio modificaría la liberación de BICNU de las N-CNSs. La cinética de liberación se realizó a una temperatura de 37°C y un pH de 7.4. Previo a la toma de cada muestra, los tubos Eppendorf se centrifugaron a 14,000xg durante 5 min para evitar sustraer N-CNSs. Se tomaron muestras de 10 µL a los tiempos 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48 y 72 h, devolviendo siempre el mismo volumen de medio tomado en el muestreo para asegurar un volumen constante durante toda la cinética de liberación. Para evaluar la concentración de BiCNU liberada al medio, primero se realizó una curva estándar con

concentraciones conocidas del fármaco (0-260  $\mu\text{M}$ ) que fueron leídas es un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop, Thermoscientific), a una longitud de onda de 260 nm; posteriormente se analizaron las muestras comparando las absorbancias obtenidas contra la curva estándar de BiCNU, realizando 3 experimentos individuales por triplicado. Finalmente, se determinó la constante de liberación del fármaco.

#### 6.4.2 *Carga de las N-CNSs con el método de evaporación del disolvente.*

La evaporación de solvente es uno de los métodos más utilizados para preparar sistemas poliméricos cargados con fármacos para formulaciones farmacéuticas <sup>58</sup>, <sup>59</sup>. Para la carga de BiCNU, 10  $\mu\text{g}$  de N-CNSs se agitaron de manera constante con BiCNU en relación 1:10 peso/peso (230  $\mu\text{M}$  disueltos previamente en etanol absoluto) por 24 h a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó el disolvente de las N-CNSs cargadas con el fármaco manteniéndolas a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar en un ambiente estéril (Anexo 1). Las N-CNSs cargadas con BiCNU se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores ensayos.

##### 6.4.2.1 *Eficiencia de liberación de carmustina de las esponjas de nanotubos de carbono dopadas con nitrógeno por el método de evaporación del disolvente.*

10  $\mu\text{g}$  de N-CNSs cargadas con BiCNU se colocaron en 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) en agitación constante y a intervalos específicos de tiempo (0, 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48 y 72 h), La cinética de liberación se realizó a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y un pH de 7.4. Previo a la toma de cada muestra, los tubos Eppendorf se centrifugaron a  $14,000\times g$  durante 5 min para evitar sustraer N-CNSs. Se tomaron muestras de 10  $\mu\text{L}$  a los tiempos 0, 0.25, 0.5,

1, 3, 5, 8, 12, 24, 48 y 72 h, devolviendo siempre el mismo volumen de medio tomado en el muestreo para asegurar un volumen constante durante toda la cinética de liberación. Para evaluar la concentración de BiCNU liberada al medio, primero se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas del fármaco (0-260  $\mu\text{M}$ ) que fueron leídas en un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop, ThermoScientific), a una longitud de onda de 260 nm; posteriormente se analizaron las muestras comparando las absorbancias obtenidas contra la curva estándar de BiCNU, realizando 3 experimentos individuales por triplicado. Finalmente, se determinó la constante de liberación del fármaco.

#### *6.5 Efectos citotóxicos de N-CNSs y N-CNSs cargados con carmustina en cultivos celulares.*

Los astrocitos fueron aislados de ratas Fisher de 3 días de edad, como se ha descrito en trabajos previos<sup>60</sup>. Las líneas de células tumorales RG2, C6 (de glioma maligno de rata) y U87 (de GBM humano) se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Todas las células se cultivaron con medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, Glutamina 4 mM y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina y se mantuvieron en condiciones estériles a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La citotoxicidad del N-CNSs se determinó en astrocitos de rata y células C6, RG2 y U87 cultivado estas células en placas de 96 pozos (1x10<sup>4</sup> células) y, después de 24 h, tratándolas con diferentes concentraciones de N-CNSs (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Anexo 2). Después de determinar la citotoxicidad de N-CNSs, 1x10<sup>4</sup> células RG2 fueron cultivadas en placas de 96 pozos y 24 h después, tratadas con ocho diluciones

seriadas 1:2, iniciando con 10 µg de N-CNSs sin cargar para el grupo uno, una concentración inicial de 230 µM de BiCNU para el grupo dos, y para el grupo tres con 10 µg de N-CNSs cargados con 230 µM BiCNU.. Adicionalmente se tuvieron dos grupos controles, un grupo sin tratamiento y un grupo tratado con 1% de etanol. Después de 24, 48 y 72 h, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, el cual se basa en la reducción del MTT a formazán por deshidrogenasas presentes en células viables <sup>61, 62</sup>. Para realizar el ensayo, después del tiempo de incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS; posteriormente, se añadieron 100 µl de MTT (5 mg/mL en PBS) a cada pozo. Las células fueron incubadas durante 4 h a 37°C; después, se retiró el medio y el formazán se eluyó con isopropanol ácido, debido a que esta sal no es soluble en agua. El isopropanol ácido que contenía el formazán, se centrifugó a 14000xg para eliminar N-CNSs. El sobrenadante fue colectado y cuantificado. La cuantificación de formazán fue determinada por densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (EON; BioTek). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad en comparación con el grupo control. La concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) del fármaco o de las N-CNSs cargadas con BiCNU se calculó utilizando el software GraphPad Prism V. 8. 0. 2.

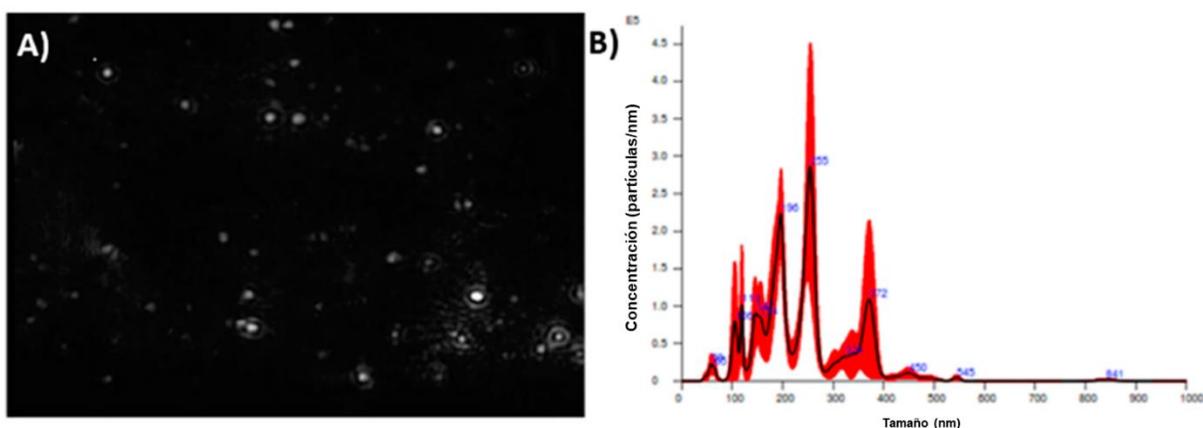
## 6.6 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos fueron presentados como media ±Desviación estándar (DE). La significancia estadística de todos los experimentos fue analizada usando una prueba T de Student con un valor p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ) indicando significancia. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v. 8.4.3

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización de N-CNSs

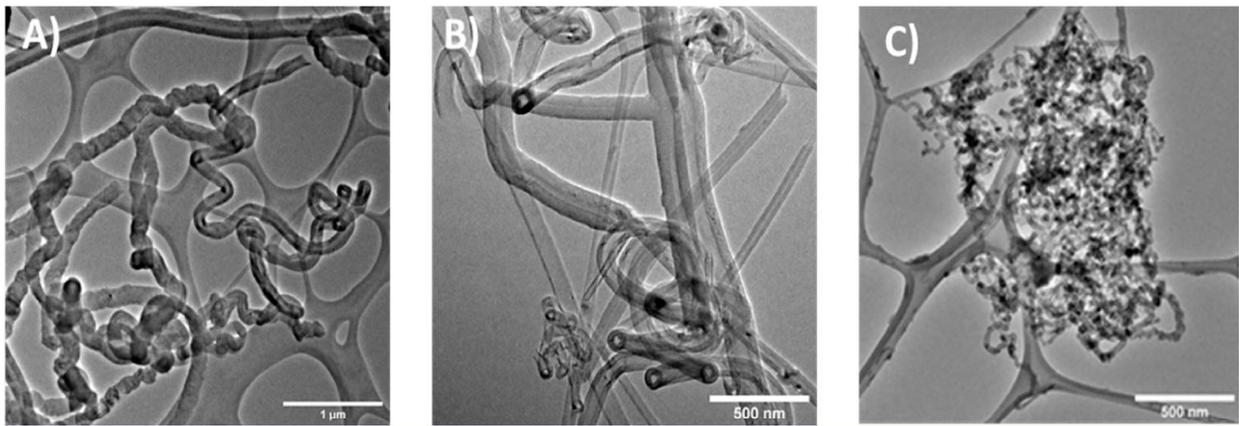
La cuantificación de tamaño de las N-CNSs se realizó utilizando la tecnología de análisis distribución de tamaño de nanopartículas (NTA). La Figura 3A muestra una imagen representativa tomada con la cámara del Nanosight dónde se pueden observar la distribución de las N-CNSs (puntos brillantes) en la solución. La figura 3B muestra un histograma con los perfiles de distribución de tamaño de las N-CNSs, mostrando que el tamaño promedio de las N-CNSs es de  $241.7 \pm 95,1$  nm (Figura 3A y B).



**Figura 3.** Distribución de tamaño de N-CNSs obtenidos por NanoSight NS300. A) imagen representativa de las N-CNSs donde se observa una distribución homogénea por toda la solución sin aparente formación de cúmulos. B) Histograma del tamaño de las N-CNSs. La línea negra muestra la media del tamaño de distribución y la línea roja muestra el error estándar de cada uno de los promedios. El experimento se realizó por quintuplicado.

Además de este análisis, la morfología de las N-CNSs fue analizada por microscopía electrónica de barrido. Las **Figura 4** corrobora que las NTCs, fabricados por el método ACVD con configuración de dos hornos, están constituidos por nanotubos curvos que se entrelazan entre sí (**Figura 4A**). Además, se puede

observar que estos CNTs tienen forma tipo “espagueti” con bordes enrollados, aunque también se observan algunos ángulos rectos con uniones tipo “T” (**Figura 4B**) y muestran una estructura porosa (**Figura 4C**). El tamaño determinado por microscopía electrónica ( $\approx 300$  nm) fue consistente con el obtenido por el análisis distribución de nanopartículas.

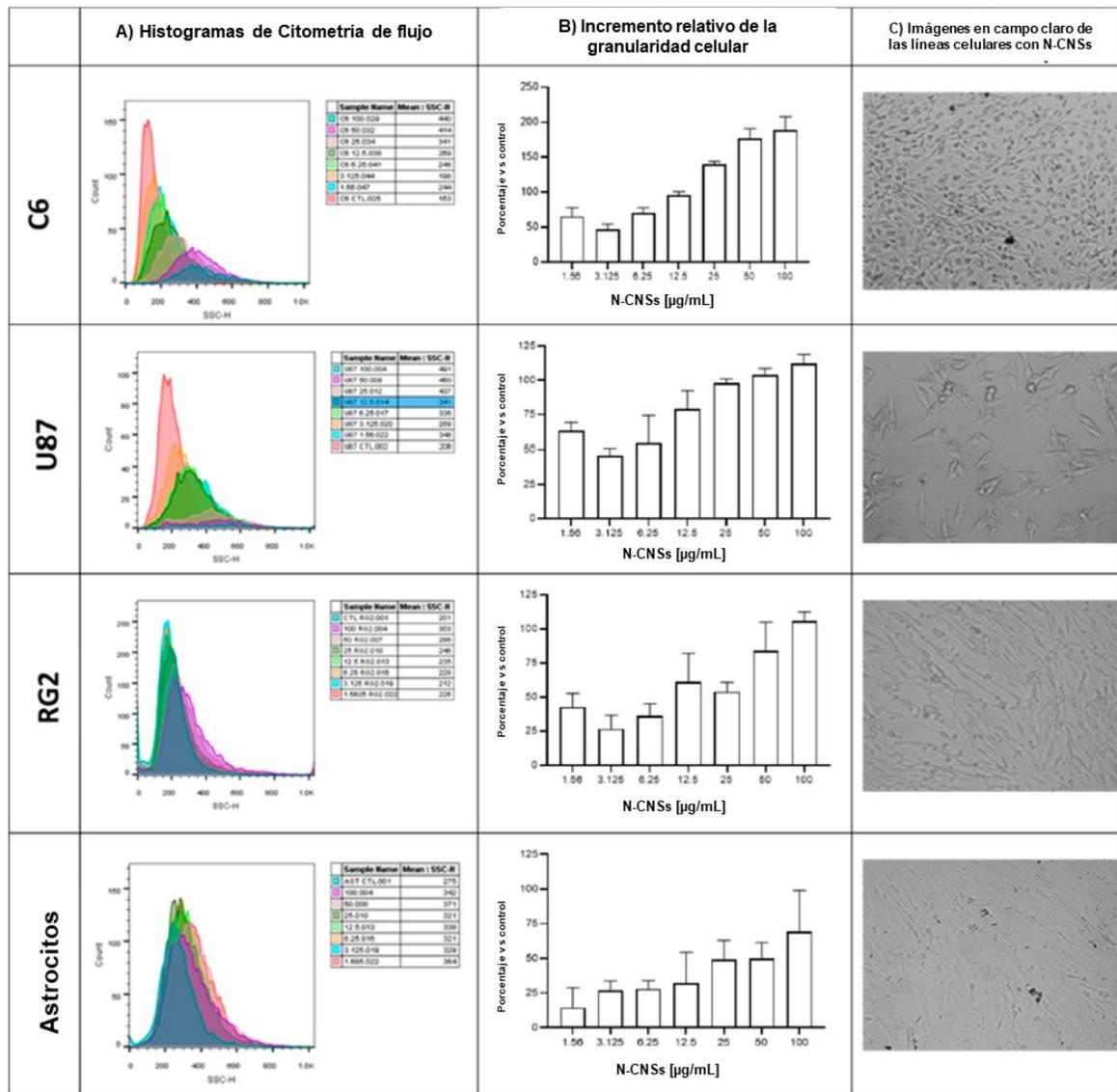


**Figura 4.** Imágenes TEM de N-CNSs, (A) Varios tipos individuales de NTCs que constituyen las N-CNSs. (B) unión tipo T de CNTs (C) Imagen de una nanoesponja construída por el entramado de CNTs formada durante la fase de preparación.

### *7.2 Los N-CNS aumentan la granularidad celular.*

Una vez realizada la caracterización, se evaluó la internalización de las N-CNSs, la cual fue determinada a través del cambio en la granularidad celular. Las N-CNSs fueron endocitadas de manera eficiente por todas las líneas celulares utilizadas de glioma maligno y GBM humano, además de los astrocitos de cultivo primario (**Figura 5**). Para estimar la internalización celular de N-CNSs se utilizó la citometría de flujo, analizando los datos obtenidos del canal (Side scatter channel (SSC)) que refleja la dispersión lateral de la luz, estimando la granularidad celular; así, se comparó la

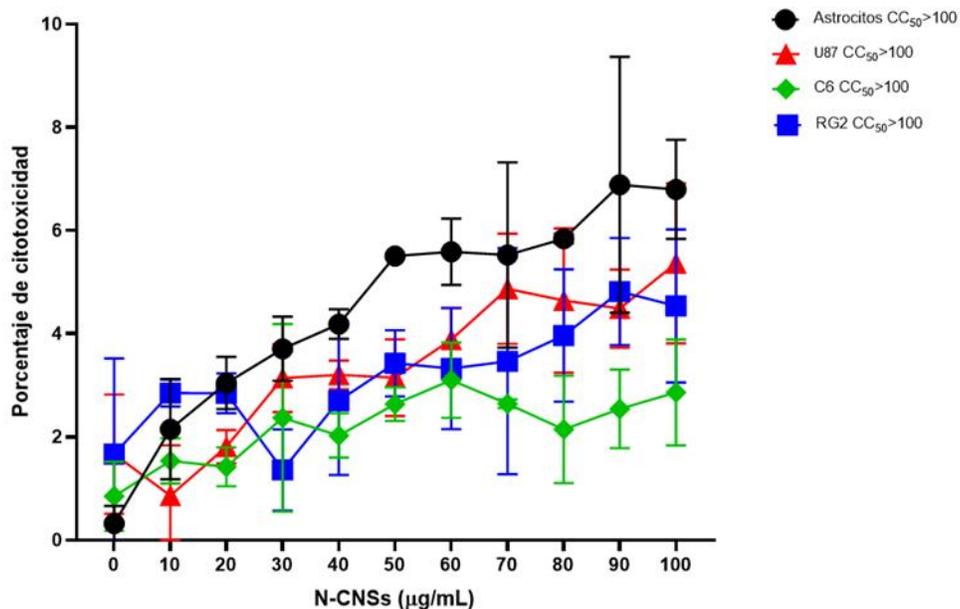
media de granularidad de cada muestra en relación con las células no tratadas (**Figura 5A**). El aumento en la granularidad celular fue proporcional a la concentración de N-CNSs que tuvieron contacto con las células (**Figura 5B**). Además, las N-CNSs se observaron dentro de las células en el citoplasma en todas las células de glioma y astrocitos primarios, indicando su internalización después de 48 h de incubación (**Figura 5C**). No se observaron cambios morfológicos en las células, pero si se observó un pequeño patrón de puntos dentro de estas.



**Figura 5.** Cambios en la granularidad celular inducidos por la internalización de N-CNSs. (A) Análisis de citometría de flujo de las líneas celulares C6, U87, RG2 y astrocitos primarios. (B) Porcentaje relativo de aumento en la complejidad interna de la célula en comparación con las células no tratadas después de la incubación con N-CNSs. (C) Imagen de campo claro representativa de la captación celular de N-CNSs después de 48 h (12.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.

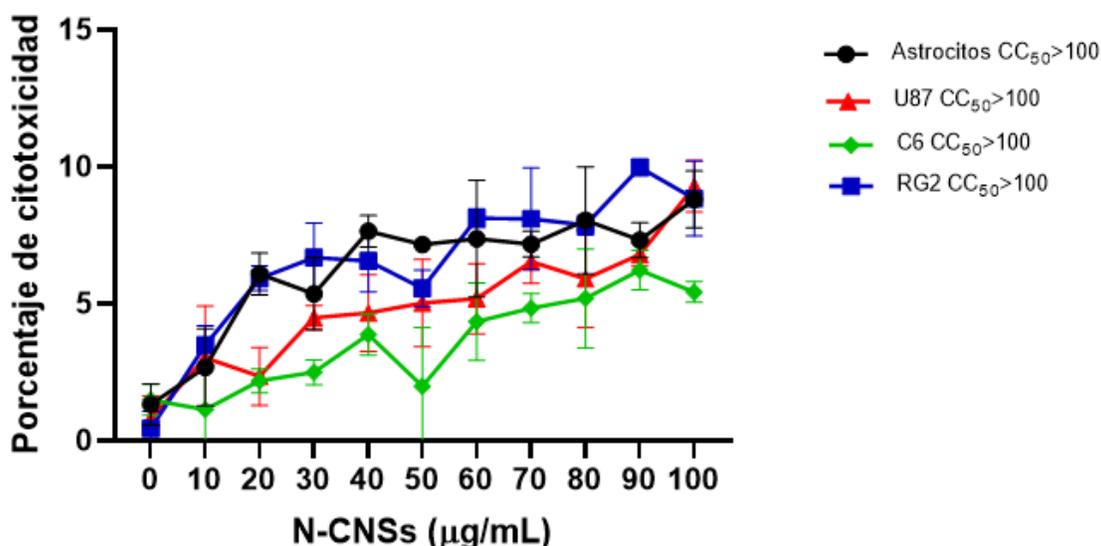
### 7.3 Efecto de los N-CNS sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT en astrocitos, y células de glioma C6, U87 y RG2 tratadas con diferentes concentraciones de N-CNSs (0-100  $\mu\text{g/mL}$ ). La adición de N-CNSs al medio de cultivo no afectó la viabilidad celular a las 24 y 48 h (**Figura 6 y 7**) y el porcentaje obtenido de citotoxicidad fue menor al 10 % en ambos tiempos y en todas la concentraciones de N-NSs probadas.



**Figura 6.** Viabilidad celular de las células de glioma y astrocitos tratados con N-CNSs durante 24 h. Se trataron astrocitos, células U87, C6 y RG2 ( $1 \times 10^6$  células por pozo en una placa de 96 pozos) con diferentes concentraciones de N-CNSs durante 24 h; el porcentaje de células muertas con respecto a las células no tratadas

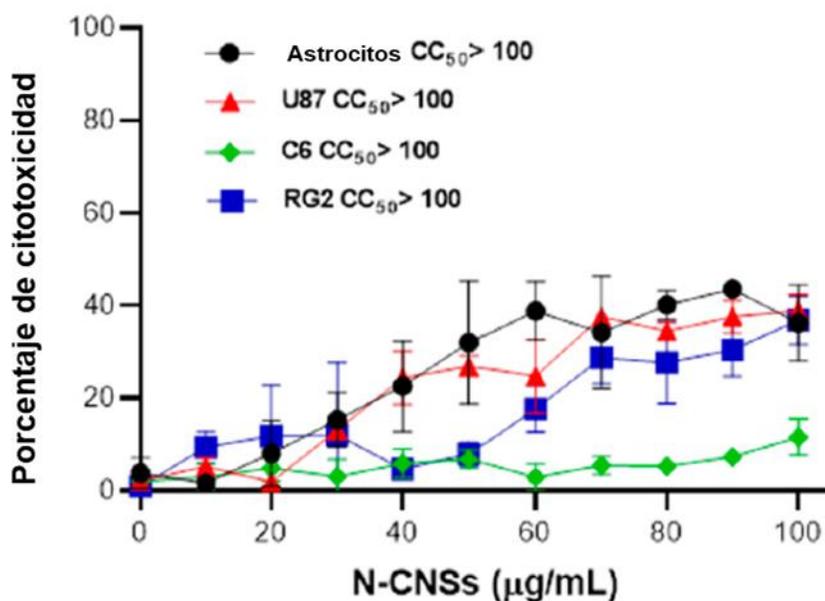
se determinó mediante ensayo MTT. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.



**Figura 7.** Viabilidad celular de las células de glioma y astrocitos tratados con N CNSs durante 48 h. Se trataron astrocitos, células U87, C6 y RG2 ( $1 \times 10^6$  células por pozo en una placa de 96 pozos) con diferentes concentraciones de N-CNSs durante 48 h; el porcentaje de células muertas con respecto a las células no tratadas se determinó mediante ensayo MTT. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.

A las 72 h, las N-CNSs aumentaron el porcentaje de muerte celular a partir de los 40 µg/mL en los astrocitos y células U87 ( $23 \pm 10$  y  $24 \pm 6$  % vs el grupo control, respectivamente). Para la línea RG2, este aumento de citotoxicidad se observó a partir de los 60 µg/mL ( $17,7 \pm 5$  vs grupo control) y para la línea celular C6, hubo un aumento de muerte celular a partir de 100 µg/mL ( $11,6 \pm 5$  vs. control) (**Figura 8**). El efecto de muerte celular observado en todas las líneas celulares, exceptuando a las células C6, fue dependiente de la concentración de N-CNSs. Aunque la viabilidad celular se vio afectada después de 72 horas de tratamiento, el CC<sub>50</sub> de las N-CNSs fue mayor a 100 µg/mL para todas las líneas celulares utilizadas. Además, se

tomaron imágenes en campo claro de todas las líneas celulares con todas las concentraciones utilizadas a 24, 48 y 72 h (**Figura suplementaria A, B, C, D**). Estas fotografías concuerdan con los resultados obtenidos, ya que en las concentraciones donde la viabilidad celular no se vio afectada, no se observaron cambios morfológicos en ninguna de las líneas celulares; sin embargo, en concentraciones más altas, se observó daño celular y disminución de la densidad celular. Considerando los resultados obtenidos después de 72 h de tratamiento, se utilizó la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de N-CNSs para experimentos posteriores.



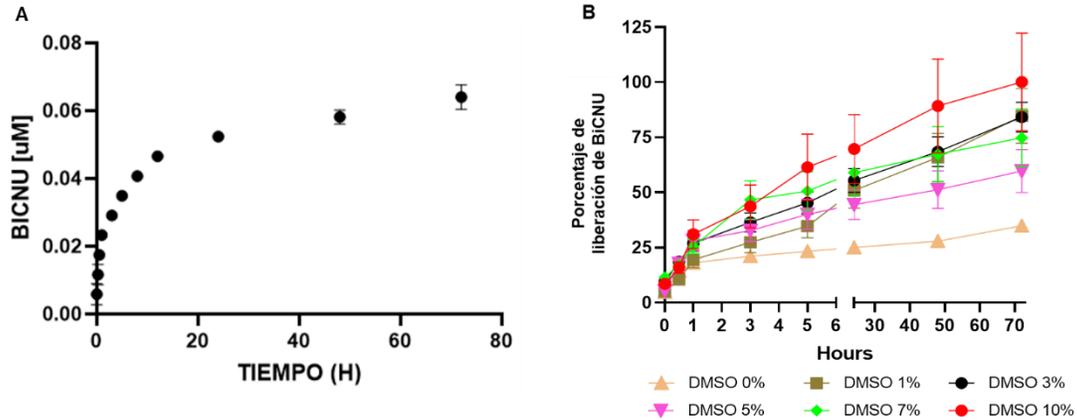
**Figura 8.** Viabilidad celular de las células de glioma y astrocitos tratados con N-CNSs durante 72 h. Se trataron astrocitos, células U87, C6 y RG2 ( $1 \times 10^6$  células por pozo en una placa de 96 pozos) con diferentes concentraciones de N-CNSs durante 72 h; el porcentaje de células muertas con respecto a las células no tratadas se determinó mediante ensayo MTT. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.

#### *7.4 Perfil de liberación de carmustina de N-CNS cargados con carmustina (N-CNSs-BiCNU) por el método de sonicación.*

La **figura 9** muestra el perfil de liberación de BiCNU proveniente de las N-CNSs en medio DMEM con diferentes concentraciones de DMSO para verificar si un mayor porcentaje de este disolvente en el medio promovía una mayor liberación de BiCNU.

La **figura 9A** muestra el perfil de liberación del quimioterapéutico en medio DMEM, donde se observa que después de 72 h, las N-CNSs cargadas mediante sonicación fueron capaces de liberar sólo 0.06  $\mu\text{M}$  del fármaco (menos del 5 % del total cargado en las N-CNSs). Al realizar el mismo experimento de liberación en medio DMEM con diferentes porcentajes de DMSO en el medio, se observó que la rapidez de la liberación del fármaco fue dependiente de la concentración de DMSO (**Figura 9B**).

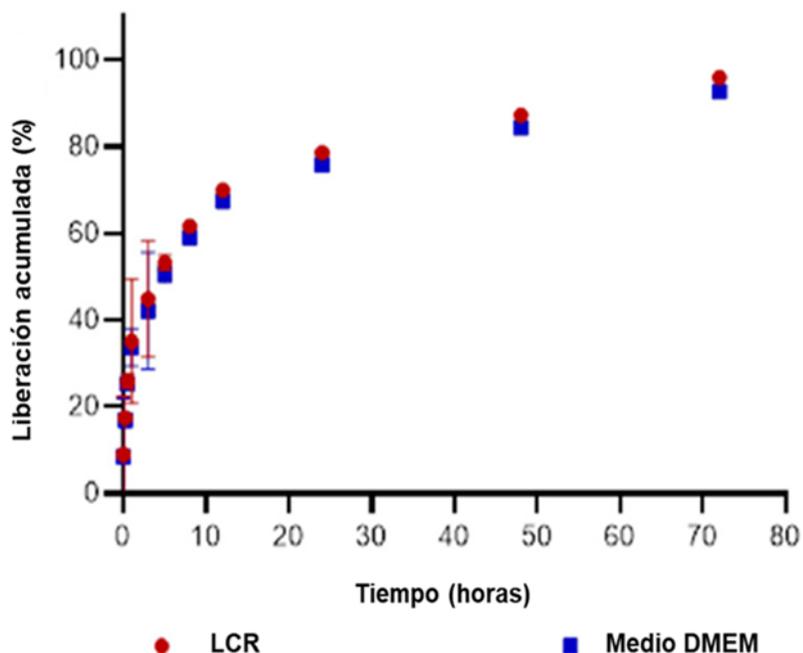
Debido a que la concentración liberada de BiCNU por este método fue muy baja, se utilizó el método de evaporación del disolvente para experimentos posteriores. De igual manera, al observar que el medio DMEM sin DMSO tenía la liberación más constante del fármaco, se decidió realizar los siguientes experimentos de liberación en medios libres de DMSO.



**Figura 9.** Perfil de liberación de BiCNU por el método de sonicación. El gráfico A muestra la media  $\pm$  DE de 3 experimentos diferentes por triplicado de la concentración de BiCNU liberado después de 72 h en medio DMEM. El gráfico B muestran la media  $\pm$  DE de 3 experimentos diferentes por triplicado del porcentaje de BiCNU liberado después de 72 h en medio DMEM con diferentes concentraciones de DMSO.

7.5 Perfil de liberación de carmustina de N-CNS cargados con carmustina (N-CNSs-BiCNU) por el método de evaporación del disolvente.

La **Figura 10** muestra los perfiles de liberación de BiCNU de las N-CNSs en DMEM y LCR. El fármaco fue liberado de las N-CNSs a un ritmo constante la liberación completa de BiCNU en ambos medios ocurrió después de 72 h. Una rápida liberación de BiCNU se observa dentro de la primera hora; luego, se observa una velocidad de liberación más lenta entre las 3 y 8 h, continuando con una liberación lenta de 24 a 72 h (completando la liberación total de BiCNU). Al realizar el análisis del perfil de liberación del fármaco, se observan 3 diferentes velocidades de liberación que se ajustan a una cinética de primer orden; la primera con una  $k= 0.4318/\text{hora}$ , la segunda velocidad con una  $k= 0.0824/\text{hora}$  y la tercera de  $0.030/\text{hora}$ . Estos pueden ser indicativo que la estructura N-CNSs retienen a BiCNU, probablemente sobre la superficie de la estructura y en el interior de la N-CNSs.

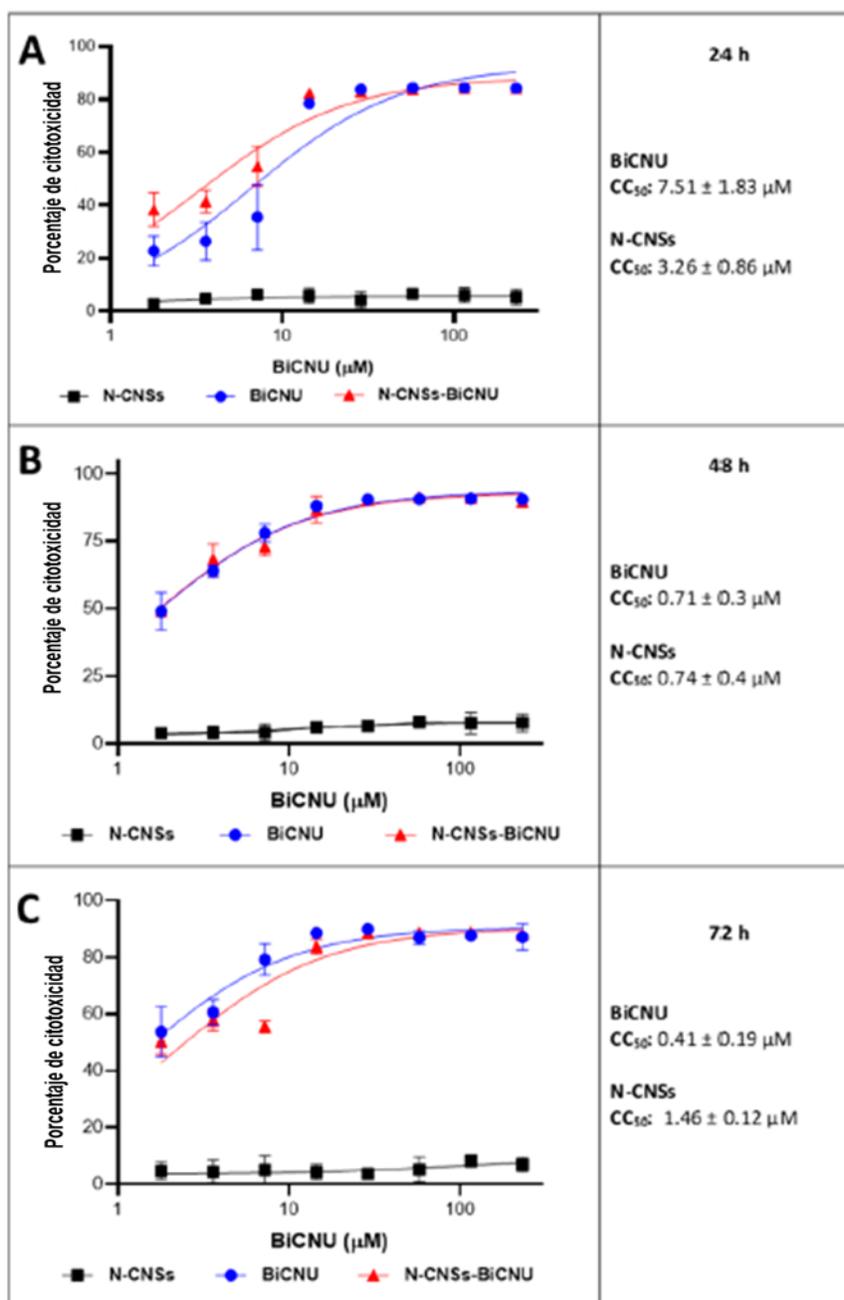


**Figura 10.** Perfil de liberación de BiCNU de las N-CNSs-BiCNU. El gráfico muestra la media  $\pm$  DE de 3 experimentos diferentes por triplicado del porcentaje de BiCNU liberado después de 72 h en LCRa (rojo) y DMEM (azul).

#### 7.6 Inducción de citotoxicidad en células de glioma RG2 por N-CNSs-BiCNU

La citotoxicidad de las N-CNSs, BiCNU, y N-CNSs-BiCNU se evaluó y comparó en células RG2 a diferentes concentraciones utilizando el ensayo de MTT. El porcentaje de muerte de las células tratadas con BiCNU y N-CNSs-BiCNU fue dependiente de la concentración del tratamiento en todos los tiempos analizados (Figura 11). Los valores de  $CC_{50}$  de BiCNU y N-CNSs-BiCNU fueron similares entre ellos ( $7,51 \pm 1,83$  y  $3,26 \pm 0,86 \mu\text{M}$  a las 24 h;  $0,71 \pm 0,3$  y  $0,74 \pm 0,4 \mu\text{M}$  a las 48 h;  $0,41 \pm 0,19$  y  $1,46 \pm 0,12 \mu\text{M}$  a las 72 h, respectivamente). Las N-CNSs no mostraron inducción de citotoxicidad en ninguno de los tiempos evaluados. Los resultados demostraron que la inducción de muerte en células RG2 era debido a la toxicidad

inducida por el fármaco en ambos casos (BiCNU y N-CNSs-BiCNU), ya que no se observaron diferencias significativas entre la citotoxicidad causada por BiCNU y N-CNSs-BiCNU. Por tanto, estos datos también indican que el transportador utilizado en estos experimentos no afectó a la capacidad citotóxica de BiCNU sobre células RG2.



**Figura 11.** Efecto de N-CNSs-BiCNU sobre la viabilidad de células RG2. BiCNU y N-CNSs-BiCNU redujeron de forma dependiente de la concentración la viabilidad celular a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). La línea negra muestra el porcentaje de citotoxicidad inducido por las N-CNSs, la azul representa el porcentaje de citotoxicidad inducido por BiCNU y la roja la citotoxicidad inducida por las N-CNSs-BiCNU. Además, se muestran las  $CC_{50}$  de BiCNU y N-CNSs-BiCNU para cada uno de los tiempos tratados. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.

## 8. Discusión

El GBM es el tumor más letal e invasivo del SNC <sup>63</sup> cuyo tratamiento consiste en máxima resección quirúrgica seguida de quimioterapia y radioterapia <sup>64</sup>. En un intento de aumentar la sobrevida y calidad de vida de los pacientes, se han utilizado otros enfoques terapéuticos para el tratamiento del glioblastoma como el uso de medicina personalizada <sup>65</sup>, obleas de carmustina para la liberación *in situ* del fármaco <sup>66</sup>, cirugía guiada por imágenes <sup>67</sup>, entre otras; sin embargo, la sobrevida sólo ha aumentado discretamente y menos de 10% de los pacientes sobreviven más de 5 años aún con todas modalidades de tratamiento aplicadas <sup>68</sup>.

Actualmente, el fármaco Gliadel es el único polímero biodegradable utilizado para la administración local de agentes quimioterapéuticos (BiCNU) para tratar pacientes con GBM, incrementado el tiempo de supervivencia hasta tres meses en comparación con el régimen de TMZ convencional <sup>69</sup>, aunque también es frecuente que los pacientes tratados con Gliadel muestren efectos secundarios. En este contexto, diversos estudios han mostrado que los pacientes tratados con Gliadel pueden padecer varios efectos adversos que incluyen aumento de la presión intracraneal, edema, convulsiones, pérdida de LCR, hidrocefalia, formación de quistes y efecto de masa <sup>66, 70</sup>; todos ellos por causa de la presión constante que

genera el polímero a las estructuras adyacentes a la resección quirúrgica <sup>71</sup>. Gran parte de estos efectos podrían ser reducidos por la sustitución del polímero de carga; ya que el usado actualmente sólo es capaz de cargar el 3.85 % de BiCNU de su peso total, que es de aproximadamente 2 gr <sup>30</sup>. Debido a estas razones es necesario encontrar otros transportadores biocompatibles no reactivos con gran capacidad de carga de agentes quimioterapéuticos, reduciendo así la cantidad del acarreador y subsecuentemente, el efecto de masa con una eficacia terapéutica similar a la propuesta terapéutica actual <sup>72</sup>.

Una de las opciones para ser usados como acarreadores de fármacos son las N-CNSs. Estas nanoestructuras podrían ser colocadas en el lecho tumoral, permitiendo la liberación de la misma cantidad de carmustina que actualmente es liberada *in situ* y al mismo tiempo, reduciendo la cantidad de acarreador. Las N-CNSs utilizadas en este estudio están formados por CNTs de paredes múltiples producidos por el método ACVD, la cual es una forma de síntesis que, como se ha reportado previamente, genera CNTs homogéneos <sup>47, 73</sup>. Las esponjas de carbono de este estudio tienen un diámetro de  $241,7 \pm 95,1$  nm. Estructuralmente hablando, las N-CNSs están compuestas por una estructura porosa que se enrolla entre sí y al final, se asemeja a una forma de espagueti. La forma y estructura especiales le confieren una alta capacidad de absorción de aceites y una naturaleza altamente hidrófoba, como se ha reportado en otras estructuras de carbono <sup>74-76</sup>. Es esta propiedad lo que permite es que las esponjas de carbono puedan cargarse con grandes cantidades de BiCNU. A diferencia de las obleas de BiCNU, una pequeña cantidad de N-CNSs podrían ser utilizadas como transportadoras de fármacos,

proporcionando la misma liberación del quimioterapéutico, reduciendo los efectos secundarios, y sirviendo como andamio celular debido a su biocompatibilidad.

Adicionalmente, las N-CNSs son endocitadas por las células aumentando su complejidad interna sin provocar cambios morfológicos significativos. La alta biocompatibilidad de las N-CNSs permite la captación celular por células de glioma y astrocitos sin inducir ninguna citotoxicidad relevante en concentraciones pequeñas. La biocompatibilidad de las nanoestructuras de carbono se ha reportado anteriormente tanto a corto <sup>77, 78</sup>, como a mediano y largo plazo <sup>79</sup>, por lo que su uso en pacientes con GBM sería relativamente seguro. Nuestros resultados demuestran que las N-CNSs no fueron citotóxicas *in vitro* en concentraciones por debajo de 40 µg/mL. La baja toxicidad inducida por N-CNSs probablemente se debe al alto grado de funcionalización del nanomaterial utilizado, ya que como se ha reportado previamente, la adición de grupos funcionales a la superficie de nanoestructuras de carbono aumenta su biocompatibilidad, permitiendo la interacción célula-CNT sin inducir citotoxicidad celular <sup>80-82</sup>. Además, se ha demostrado que la funcionalización de estos nanomateriales reduce significativamente la inmunogenicidad y la toxicidad <sup>78, 79, 83</sup>. En este estudio, cantidades inferiores a 40 µg de N-CNSs no indujeron toxicidad en las células utilizadas; y debido a la alta capacidad de carga las N-CNSs, utilizamos 10 µg de estas nanoestructuras para experimentos posteriores, cargados con 10 veces su peso de BiCNU. Es importante considerar que hay muchos factores podrían alterar la citotoxicidad inducida por N-CNSs, como el tamaño, la formulación y capacidad de endocitosis <sup>40, 84</sup>. El alto grado de hidrofobicidad de las N-CNSs permite que sean endocitadas vía el reconocimiento del receptor tipo Tip,

comúnmente expresado en células cancerígenas, incluidas células de GBM a través de la unión al receptor que se expresa comúnmente en las células cancerosas, incluido el glioblastoma <sup>84</sup>. Otra posibilidad es que los N-CNSs podrían interactuar con varias biomoléculas que interfieren con las funciones biológicas esenciales para el funcionamiento celular, lo que daría como resultado la inducción de apoptosis <sup>85</sup>.

Los perfiles de liberación de BiCNU demostraron alta capacidad para absorber fármacos de la N-CNSs. Inicialmente, se utilizó el método de sonicación de las N-CNSs en BICNU con DMSO, al ser este uno de los diluyentes del fármaco. Este método se ha probado en la carga de fármacos en otras nanoestructuras <sup>86, 87</sup>; sin embargo, la eficiencia de carga fue muy baja cuando utilizamos este método con las N-CNS. Además, estudios previos han demostrado que el uso de sonicación en nanomateriales puede modificar la estructura e incluso, causar rompimientos entre las uniones de los nanotubos <sup>88, 89</sup>. Por esta razón, se utilizó la técnica de evaporación de solvente que permitió una carga eficaz del fármaco. Esta característica parece ser debida a la alta afinidad de la superficie de carbono con el fármaco (BiCNU) y también debido a su estructura; como los nanotubos son huecos lo que permite la retención de BiCNU sobre a superficie y dentro de las N-CNSs. Otras estructuras de carbono porosas también han demostrado una gran capacidad para absorber fármacos hidrófobos <sup>90</sup>; el perfil de liberación obtenido con LCRa y medio DMEM apoyan esta hipótesis. La liberación acumulada de BiCNU de los N-CNSs alcanzó el 50 % en las primeras 5 h del ensayo. La velocidad de las cinéticas de liberación puede depender de diversos factores, como el tipo de nanoesponjas utilizado, la estructura porosa, el tamaño y la afinidad fármaco-nanoestructura, las

cuales pueden acelerar o prolongar la cinética de liberación del fármaco <sup>91,92</sup>. Se ha descrito que los nanotubos de carbono pueden interactuar con la carmustina mediante interacciones débiles, tales como fuerzas de Vander Walls, por lo cual la liberación de BiCNU se da de manera constante <sup>93</sup>. Los perfiles de liberación que se observaron en este estudio permiten predecir que es posible que se puedan utilizar N-CNSs cargadas con BiCNU de la misma forma en la que el Gliadel se usa actualmente.

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* de las N-CNSs-BiCNU se realizó en células RG2 a diferentes concentraciones, comparando la citotoxicidad inducida por este grupo con BiCNU o N-CNSs en el mismo rango de concentración y tiempo. Se observó menos del 10% de reducción de la viabilidad en las células tratadas con N-CNS solas, lo que indica una vez más, la baja citotoxicidad que estas nanoesponjas muestran. En los grupos tratados con BiCNU y N-CNSs-BiCNU, las células mostraron alta toxicidad en las células RG2 con  $CC_{50}$  similares en todos los tiempos utilizados. Estos resultados indican que el principal efecto citotóxico fue inducido por el quimioterapéutico y no por el acarreador, por lo que las N-CNSs podrían administrar BiCNU de manera efectiva sin inducir una citotoxicidad celular relevante a estructuras sanas del SNC. Considerando estos resultados, es posible hipotetizar que las N-CNSs de carbono podrían ser cargadas con BiCNU y liberar su contenido en el lecho tumoral sin ocasionar daño al tejido cerebral adyacente. Se ha observado que otras estructuras de carbono, al ser implantadas en tejido, no se pueden degradar y permanecen en el sitio del implante sin ser eliminadas naturalmente <sup>94</sup>, lo cual podría a largo plazo, generar daño tisular debido a una

inflamación crónica generada por un cuerpo extraño; sin embargo, estas N-CNSs tienen la ventaja adicional de tener una alta biocompatibilidad, lo cual les ha permitido incluso funcionar como andamiaje para el crecimiento de diferentes tipos celulares <sup>95</sup>.

## **9. Conclusiones**

Nuestros resultados indican que las N-CNSs son transportadores con gran capacidad de carga y biocompatibles que podrían ser considerados como una herramienta terapéutica óptima contra diversas formas de cáncer.

## 10. Referencias

1. Dolecek, T. A.; Propp, J. M.; Stroup, N. E.; Kruchko, C., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology* **2012**, *14 Suppl 5*, v1-49.
2. Garcia, C. R.; Slone, S. A.; Dolecek, T. A.; Huang, B.; Neltner, J. H.; Villano, J. L., Primary central nervous system tumor treatment and survival in the United States, 2004-2015. *Journal of neuro-oncology* **2019**.
3. DeAngelis, L. M., Brain tumors. *The New England journal of medicine* **2001**, *344* (2), 114-23.
4. McNeill, K. A., Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin* **2016**, *34* (4), 981-998.
5. Vienne-Jumeau, A.; Tafani, C.; Ricard, D., Environmental risk factors of primary brain tumors: A review. *Rev Neurol (Paris)* **2019**, *175* (10), 664-678.
6. Ostrom, Q. T.; Adel Fahmideh, M.; Cote, D. J.; Muskens, I. S.; Schraw, J. M.; Scheurer, M. E.; Bondy, M. L., Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro-oncology* **2019**, *21* (11), 1357-1375.
7. Ostrom, Q. T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S., CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-oncology* **2019**, *21* (Suppl 5), v1-v100.

8. Figarella-Branger, D.; Mokhtari, K.; Colin, C.; Uro-Coste, E.; Jouvret, A.; Dehais, C.; Carpentier, C.; Villa, C.; Maurage, C. A.; Eimer, S.; Polivka, M.; Vignaud, J. M.; Laquerriere, A.; Sevestre, H.; Lechapt-Zalcman, E.; Quintin-Roue, I.; Aubriot-Lorton, M. H.; Diebold, M. D.; Viennet, G.; Adam, C.; Loussouarn, D.; Michalak, S.; Rigau, V.; Heitzmann, A.; Vandebos, F.; Forest, F.; Chiforeanu, D.; Tortel, M. C.; Labrousse, F.; Chenard, M. P.; Nguyen, A. T.; Varlet, P.; Kemeny, J. L.; Levillain, P. M.; Cazals-Hatem, D.; Richard, P.; Delattre, J. Y.; Network, P., Prognostic Relevance of Histomolecular Classification of Diffuse Adult High-Grade Gliomas with Necrosis. *Brain pathology* **2015**, *25* (4), 418-28.
9. Wirsching, H. G.; Galanis, E.; Weller, M., Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* **2016**, *134*, 381-97.
10. Bohn, A.; Braley, A.; Rodriguez de la Vega, P.; Zevallos, J. C.; Barengo, N. C., The association between race and survival in glioblastoma patients in the US: A retrospective cohort study. *PloS one* **2018**, *13* (6), e0198581.
11. Ostrom, Q. T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S., CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-oncology* **2020**, *22* (12 Suppl 2), iv1-iv96.
12. Alexander, B. M.; Cloughesy, T. F., Adult Glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**, *35* (21), 2402-2409.
13. Aguirre-Cruz, L.; Rodriguez-Perez, C. E.; de la Cruz-Aguilera, D. L.; Acosta-Castillo, G. I.; Ruano-Calderon, L.; Martinez-Moreno, M.; Sotelo, J., [Descriptive epidemiology and frequency variations of astrocytic tumors in the National Institute

of Neurology and Neurosurgery of Mexico]. *Salud Publica Mex* **2020**, 62 (3), 255-261.

14. Ohgaki, H.; Kleihues, P., The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013**, 19 (4), 764-72.

15. Ohgaki, H.; Kleihues, P., Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **2007**, 170 (5), 1445-53.

16. Omuro, A.; DeAngelis, L. M., Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* **2013**, 310 (17), 1842-50.

17. Stoyanov, G. S.; Dzhenkov, D. L., On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia Med (Plovdiv)* **2018**, 60 (1), 48-66.

18. Braun, K.; Ahluwalia, M. S., Treatment of Glioblastoma in Older Adults. *Curr Oncol Rep* **2017**, 19 (12), 81.

19. Batash, R.; Asna, N.; Schaffer, P.; Francis, N.; Schaffer, M., Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current medicinal chemistry* **2017**, 24 (27), 3002-3009.

20. Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O.; European Organisation for, R.; Treatment of Cancer Brain, T.; Radiotherapy, G.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant

temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **2005**, 352 (10), 987-96.

21. Dasari, S.; Tchounwou, P. B., Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* **2014**, 740, 364-78.

22. Rancoule, C.; Guy, J. B.; Vallard, A.; Ben Mrad, M.; Rehailia, A.; Magne, N., [50th anniversary of cisplatin]. *Bulletin du cancer* **2017**, 104 (2), 167-176.

23. Toro-Cordova, A.; Ledezma-Gallegos, F.; Mondragon-Fuentes, L.; Jurado, R.; Medina, L. A.; Perez-Rojas, J. M.; Garcia-Lopez, P., Determination of Liposomal Cisplatin by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application in Pharmacokinetic Studies. *Journal of chromatographic science* **2016**, 54 (6), 1016-21.

24. Stupp, R.; Dietrich, P. Y.; Ostermann Kraljevic, S.; Pica, A.; Maillard, I.; Maeder, P.; Meuli, R.; Janzer, R.; Pizzolato, G.; Miralbell, R.; Porchet, F.; Regli, L.; de Tribolet, N.; Mirimanoff, R. O.; Leyvraz, S., Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2002**, 20 (5), 1375-82.

25. Stupp, R.; Hegi, M. E.; Gilbert, M. R.; Chakravarti, A., Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2007**, 25 (26), 4127-36.

26. Westphal, M.; Hilt, D. C.; Bortey, E.; Delavault, P.; Olivares, R.; Warnke, P. C.; Whittle, I. R.; Jaaskelainen, J.; Ram, Z., A phase 3 trial of local chemotherapy

with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology* **2003**, 5 (2), 79-88.

27. O'Neil, M. J., The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, . **2006.**, NJ: Merck and Co., Inc., , p. 300.

28. Fisher, J. P.; Adamson, D. C., Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines* **2021**, 9 (3).

29. Bota, D. A.; Desjardins, A.; Quinn, J. A.; Affronti, M. L.; Friedman, H. S., Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther Clin Risk Manag* **2007**, 3 (5), 707-15.

30. Kleinberg, L., Polifeprosan 20, 3.85% carmustine slow release wafer in malignant glioma: patient selection and perspectives on a low-burden therapy. *Patient Prefer Adherence* **2016**, 10, 2397-2406.

31. Nagpal, S., The role of BCNU polymer wafers (Gliadel) in the treatment of malignant glioma. *Neurosurgery clinics of North America* **2012**, 23 (2), 289-95, ix.

32. Chaichana, K. L.; Zaidi, H.; Pendleton, C.; McGirt, M. J.; Grossman, R.; Weingart, J. D.; Olivi, A.; Quinones-Hinojosa, A.; Brem, H., The efficacy of carmustine wafers for older patients with glioblastoma multiforme: prolonging survival. *Neurol Res* **2011**, 33 (7), 759-64.

33. Garside, R.; Pitt, M.; Anderson, R.; Rogers, G.; Dyer, M.; Mealing, S.; Somerville, M.; Price, A.; Stein, K., The effectiveness and cost-effectiveness of carmustine implants and temozolomide for the treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment* **2007**, 11 (45), iii-iv, ix-221.

34. Yoshinori Ando, X. Z., Synthesis of Carbon Nanotubes by Arc-Discharge Method. *New diamond and frontier carbon technology* **2006**, 16 (3).
35. He, H.; Pham-Huy, L. A.; Dramou, P.; Xiao, D.; Zuo, P.; Pham-Huy, C., Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. *BioMed research international* **2013**, 2013, 578290.
36. Aschberger, K.; Johnston, H. J.; Stone, V.; Aitken, R. J.; Hankin, S. M.; Peters, S. A.; Tran, C. L.; Christensen, F. M., Review of carbon nanotubes toxicity and exposure--appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Critical reviews in toxicology* **2010**, 40 (9), 759-90.
37. Hernandez-Pedro, N. Y.; Rangel-Lopez, E.; Magana-Maldonado, R.; de la Cruz, V. P.; del Angel, A. S.; Pineda, B.; Sotelo, J., Application of nanoparticles on diagnosis and therapy in gliomas. *BioMed research international* **2013**, 2013, 351031.
38. Chen, H.; Ma, X.; Li, Z.; Shi, Q.; Zheng, W.; Liu, Y.; Wang, P., Functionalization of single-walled carbon nanotubes enables efficient intracellular delivery of siRNA targeting MDM2 to inhibit breast cancer cells growth. *Biomed Pharmacother* **2012**, 66 (5), 334-8.
39. Coccini T, R. E., Sarigiannis DA, Mustarelli P, Profumo A, Manzo L. , The degree of functionalization affects in vitro cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes (CNTs). . *Toxicology letters* **2009**, 189S, S57-S273.
40. Caoduro, C.; Hervouet, E.; Girard-Thernier, C.; Gharbi, T.; Boulahdour, H.; Delage-Mourroux, R.; Pudlo, M., Carbon nanotubes as gene carriers: Focus on internalization pathways related to functionalization and properties. *Acta biomaterialia* **2017**, 49, 36-44.

41. Kong, H.; Gao, C.; Yan, D., Controlled functionalization of multiwalled carbon nanotubes by in situ atom transfer radical polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (2), 412-3.
42. Shiba, K., Functionalization of carbon nanomaterials by evolutionary molecular engineering: potential application in drug delivery systems. *J Drug Target* **2006**, *14* (7), 512-8.
43. Al-Jamal, K. T.; Nerl, H.; Muller, K. H.; Ali-Boucetta, H.; Li, S.; Haynes, P. D.; Jinschek, J. R.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K.; Porter, A. E., Cellular uptake mechanisms of functionalised multi-walled carbon nanotubes by 3D electron tomography imaging. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2627-35.
44. Antonelli, A.; Serafini, S.; Menotta, M.; Sfara, C.; Pierige, F.; Giorgi, L.; Ambrosi, G.; Rossi, L.; Magnani, M., Improved cellular uptake of functionalized single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* **2010**, *21* (42), 425101.
45. Ciofani, G.; Raffa, V.; Vittorio, O.; Cuschieri, A.; Pizzorusso, T.; Costa, M.; Bardi, G., In vitro and in vivo biocompatibility testing of functionalized carbon nanotubes. *Methods Mol Biol* **2010**, *625*, 67-83.
46. Fabbro, C.; Ali-Boucetta, H.; Da Ros, T.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M., Targeting carbon nanotubes against cancer. *Chemical communications* **2012**, *48* (33), 3911-26.
47. Munoz-Sandoval, E.; Fajardo-Diaz, J. L.; Sanchez-Salas, R.; Cortes-Lopez, A. J.; Lopez-Urias, F., Two Sprayer CVD Synthesis of Nitrogen-doped Carbon Sponge-type Nanomaterials. *Scientific reports* **2018**, *8* (1), 2983.
48. Karimi, M.; Solati, N.; Ghasemi, A.; Estiar, M. A.; Hashemkhani, M.; Kiani, P.; Mohamed, E.; Saeidi, A.; Taheri, M.; Avci, P.; Aref, A. R.; Amiri, M.; Baniasadi,

F.; Hamblin, M. R., Carbon nanotubes part II: a remarkable carrier for drug and gene delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2015**, *12* (7), 1089-105.

49. Portney, N. G.; Ozkan, M., Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *384* (3), 620-30.

50. Shao, W.; Paul, A.; Zhao, B.; Lee, C.; Rodes, L.; Prakash, S., Carbon nanotube lipid drug approach for targeted delivery of a chemotherapy drug in a human breast cancer xenograft animal model. *Biomaterials* **2013**, *34* (38), 10109-10119.

51. Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhang, Y., The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale research letters* **2011**, *6*, 555.

52. Correa-Duarte, M. A.; Wagner, N.; Rojas-Chapana, J.; Morsczech, C.; Thie, M.; Giersig, M., Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano letters* **2004**, *4* (11), 2233-2236.

53. Lee, S. J.; Zhu, W.; Nowicki, M.; Lee, G.; Heo, D. N.; Kim, J.; Zuo, Y. Y.; Zhang, L. G., 3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration. *J Neural Eng* **2018**, *15* (1), 016018.

54. Liu, X.; George, M. N.; Park, S.; Miller li, A. L.; Gaihre, B.; Li, L.; Waletzki, B. E.; Terzic, A.; Yaszemski, M. J.; Lu, L., 3D-printed scaffolds with carbon nanotubes for bone tissue engineering: Fast and homogeneous one-step functionalization. *Acta biomaterialia* **2020**, *111*, 129-140.

55. Lay, C. L.; Liu, H. Q.; Tan, H. R.; Liu, Y., Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology* **2010**, *21* (6), 065101.
56. Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H., Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS nano* **2007**, *1* (1), 50-6.
57. Sahoo, N. G.; Bao, H.; Pan, Y.; Pal, M.; Kakran, M.; Cheng, H. K.; Li, L.; Tan, L. P., Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications* **2011**, *47* (18), 5235-7.
58. Hamzaoui, A.; Laraba-Djebari, F., Development and evaluation of polymeric nanoparticles as a delivery system for snake envenoming prevention. *Biologicals* **2021**.
59. Zou, Y.; Mei, D.; Yuan, J.; Han, J.; Xu, J.; Sun, N.; He, H.; Yang, C.; Zhao, L., Preparation, Characterization, Pharmacokinetic, and Therapeutic Potential of Novel 6-Mercaptopurine-Loaded Oral Nanomedicines for Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of nanomedicine* **2021**, *16*, 1127-1141.
60. Seoane, M.; Iglesias, P.; Gonzalez, T.; Dominguez, F.; Fraga, M.; Aliste, C.; Forteza, J.; Costoya, J. A., Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression. *PloS one* **2008**, *3* (11), e3632.
61. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D., Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, *2018* (6).

62. Fotakis, G.; Timbrell, J. A., In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters* **2006**, *160* (2), 171-7.
63. Witthayanuwat, S.; Pese, M.; Supaadirek, C.; Supakalin, N.; Thamronganantasakul, K.; Krusun, S., Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev* **2018**, *19* (9), 2613-2617.
64. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idhah, A.; Ahluwalia, M. S.; Fink, K.; Di Meco, F.; Lieberman, F.; Zhu, J. J.; Stragliotto, G.; Tran, D.; Brem, S.; Hottinger, A.; Kirson, E. D.; Lavy-Shahaf, G.; Weinberg, U.; Kim, C. Y.; Paek, S. H.; Nicholas, G.; Bruna, J.; Hirte, H.; Weller, M.; Palti, Y.; Hegi, M. E.; Ram, Z., Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318* (23), 2306-2316.
65. Bagley, S. J.; Desai, A. S.; Linette, G. P.; June, C. H.; O'Rourke, D. M., CAR T-cell therapy for glioblastoma: recent clinical advances and future challenges. *Neuro-oncology* **2018**, *20* (11), 1429-1438.
66. Xing, W. K.; Shao, C.; Qi, Z. Y.; Yang, C.; Wang, Z., The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* **2015**, *9*, 3341-8.
67. Lakomkin, N.; Hadjipanayis, C. G., Fluorescence-guided surgery for high-grade gliomas. *J Surg Oncol* **2018**, *118* (2), 356-361.
68. deSouza, R. M.; Shaweis, H.; Han, C.; Sivasubramaniam, V.; Brazil, L.; Beaney, R.; Sadler, G.; Al-Sarraj, S.; Hampton, T.; Logan, J.; Hurwitz, V.;

Bhangoo, R.; Gullan, R.; Ashkan, K., Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? *Br J Cancer* **2016**, *114* (12), e20.

69. Xiao, Z. Z.; Wang, Z. F.; Lan, T.; Huang, W. H.; Zhao, Y. H.; Ma, C.; Li, Z. Q., Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol* **2020**, *11*, 1036.

70. Yu, F.; Asghar, S.; Zhang, M.; Zhang, J.; Ping, Q.; Xiao, Y., Local strategies and delivery systems for the treatment of malignant gliomas. *J Drug Target* **2019**, *27* (4), 367-378.

71. Ashby, L. S.; Smith, K. A.; Stea, B., Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol* **2016**, *14* (1), 225.

72. Rode, A.; Sharma, S.; Mishra, D. K., Carbon Nanotubes: Classification, Method of Preparation and Pharmaceutical Application. *Current drug delivery* **2018**, *15* (5), 620-629.

73. Dai, H., Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. *Accounts of chemical research* **2002**, *35* (12), 1035-44.

74. Liu, Z.; Tabakman, S.; Welsher, K.; Dai, H., Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery. *Nano research* **2009**, *2* (2), 85-120.

75. Nimmagadda, A.; Thurston, K.; Nollert, M. U.; McFetridge, P. S., Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2006**, *76* (3), 614-25.

76. Yang, J.; Zhang, Z.; Men, X.; Xu, X.; Zhu, X., Reversible superhydrophobicity to superhydrophilicity switching of a carbon nanotube film via alternation of UV irradiation and dark storage. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26* (12), 10198-202.
77. Sitharaman, B.; Shi, X.; Walboomers, X. F.; Liao, H.; Cuijpers, V.; Wilson, L. J.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A., In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* **2008**, *43* (2), 362-70.
78. Smart, S. K.; Cassady, A. I.; Lu, G. Q.; Martin, D. J., The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* **2006**, *44* (6), 1034-1047.
79. Galassi, T. V.; Antman-Passig, M.; Yaari, Z.; Jessurun, J.; Schwartz, R. E.; Heller, D. A., Long-term in vivo biocompatibility of single-walled carbon nanotubes. *PloS one* **2020**, *15* (5), e0226791.
80. Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A., Organic functionalization of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (5), 760-1.
81. Madani, S. Y.; Tan, A.; Dwek, M.; Seifalian, A. M., Functionalization of single-walled carbon nanotubes and their binding to cancer cells. *International journal of nanomedicine* **2012**, *7*, 905-14.
82. Mattson, M. P.; Haddon, R. C.; Rao, A. M., Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J Mol Neurosci* **2000**, *14* (3), 175-82.

83. Kim, J. S.; Song, K. S.; Lee, J. H.; Yu, I. J., Evaluation of biocompatible dispersants for carbon nanotube toxicity tests. *Archives of toxicology* **2011**, *85* (12), 1499-508.
84. Maruyama, K.; Haniu, H.; Saito, N.; Matsuda, Y.; Tsukahara, T.; Kobayashi, S.; Tanaka, M.; Aoki, K.; Takanashi, S.; Okamoto, M.; Kato, H., Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells. *BioMed research international* **2015**, *2015*, 793186.
85. Ye, S.; Jiang, Y.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wu, Y.; Hou, Z.; Zhang, Q., Multi-walled carbon nanotubes induce apoptosis in RAW 264.7 cell-derived osteoclasts through mitochondria-mediated death pathway. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2012**, *12* (3), 2101-12.
86. Keum, C. G.; Noh, Y. W.; Baek, J. S.; Lim, J. H.; Hwang, C. J.; Na, Y. G.; Shin, S. C.; Cho, C. W., Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International journal of nanomedicine* **2011**, *6*, 2225-34.
87. Luo, X.; Matranga, C.; Tan, S.; Alba, N.; Cui, X. T., Carbon nanotube nanoreservoir for controlled release of anti-inflammatory dexamethasone. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 6316-23.
88. Pradhan, S.; Hedberg, J.; Blomberg, E.; Wold, S.; Odnevall Wallinder, I., Effect of sonication on particle dispersion, administered dose and metal release of non-functionalized, non-inert metal nanoparticles. *J Nanopart Res* **2016**, *18* (9), 285.
89. Cronholm, P.; Midander, K.; Karlsson, H. L.; Elihn, K.; Wallinder, I. O.; Moller, L., Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper

nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells. *Nanotoxicology* **2011**, *5* (2), 269-81.

90. Chen, Y.; Xu, P.; Wu, M.; Meng, Q.; Chen, H.; Shu, Z.; Wang, J.; Zhang, L.; Li, Y.; Shi, J., Colloidal RBC-shaped, hydrophilic, and hollow mesoporous carbon nanocapsules for highly efficient biomedical engineering. *Adv Mater* **2014**, *26* (25), 4294-301.

91. Mulvihill, J. J.; Cunnane, E. M.; Ross, A. M.; Duskey, J. T.; Tosi, G.; Grabrucker, A. M., Drug delivery across the blood-brain barrier: recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine (Lond)* **2020**, *15* (2), 205-214.

92. Jain, A. K.; Thareja, S., In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2019**, *47* (1), 524-539.

93. Taherpour Avat, D. A. H., Kariminya Ronin, Theoretical study of diffusion flow of anticancer medicines through single-wall armchair (10, 10) carbon nanotube. *Advances in Nanochemistry* **2019**, *1* (1), 56-61.

94. Romano-Feinholz, S.; Salazar-Ramiro, A.; Munoz-Sandoval, E.; Magana-Maldonado, R.; Hernandez Pedro, N.; Rangel Lopez, E.; Gonzalez Aguilar, A.; Sanchez Garcia, A.; Sotelo, J.; Perez de la Cruz, V.; Pineda, B., Cytotoxicity induced by carbon nanotubes in experimental malignant glioma. *International journal of nanomedicine* **2017**, *12*, 6005-6026.

95. Hirata, E.; Menard-Moyon, C.; Venturelli, E.; Takita, H.; Watari, F.; Bianco, A.; Yokoyama, A., Carbon nanotubes functionalized with fibroblast growth factor

accelerate proliferation of bone marrow-derived stromal cells and bone formation.

*Nanotechnology* **2013**, 24 (43), 435101.

## 11. Anexos

### Anexo 1. Técnica de evaporación de disolvente para la carga de N-CNSs con BiCNU.

Para la carga del 100% de BiCNU en las N-CNSs, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Disolver 230  $\mu$ M de BiCNU en etanol absoluto a temperatura ambiente.
2. Pesar 10  $\mu$ g de N-CNSs.
3. Una vez realizados el paso 1 y 2, en un ambiente estéril, mezclar las N-CNSs con el etanol que contiene BiCNU. Colocar esta mezcla en un frasco estéril.
4. Adicionar a la mezcla un agitador magnético de 4 mm estéril.
5. Agitar durante 24 h a temperatura ambiente.
6. Una vez cumplido el tiempo de agitación, llevar nuevamente la mezcla a una campana de flujo laminar para mantener el ambiente estéril.
7. Una vez en la campana, destapar el frasco y colocar la solución en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
8. Mantener el tubo eppendorf abierto para permitir la evaporación del disolvente.
9. Una vez que el solvente este completamente evaporado, cerrar el tubo eppendorf y congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el uso de LAS N-CNSs cargadas con BiCNU.

## **Anexo 2: Procedimiento para la siembra de placas de 96 pozos.**

Una vez que las botellas de 75 cm<sup>2</sup> alcanzaron una confluencia del 100 %, las células fueron colectadas mediante un tratamiento enzimático con tripsina, contadas y ajustadas a 10 000 células/pozo para ser sembradas en placas de 96 pozos. El procedimiento para sembrar las líneas celulares se realizó de la siguiente manera:

1. El medio de cultivo fue retirado de las botellas de cultivo.
2. Para retirar los restos de medio, las botellas de cultivo fueron lavadas con 5 mL de solución salina. Este procedimiento se realizó 3 veces.
3. Una vez retirada la solución salina, se agregó a la botella de cultivo 1 mL de tripsina, asegurándose de cubrir toda la monocapa con la tripsina.
4. La botella de cultivo con la tripsina fue incubada en una posición horizontal por 5 min.
5. Una vez cumplido el tiempo, la tripsina fue inactivada con 10 mL del medio de DMEM. Las células, ya despegadas gracias al tratamiento con tripsina, fueron homogenizadas en el medio con una pipeta.
6. El medio con las células fue transferido a un tubo Falcon de 15 mL, cerrado, retirado de la campana de flujo laminar y centrifugado a 2000 rpm durante 5 min en centrifuga refrigerada.
7. Una vez terminado el tiempo de centrifugación, el tubo Falcon fue llevado a la campana (condiciones de esterilidad) cuidadosamente para evitar deshacer el botón de células, y se decantó el medio.
8. El botón de células se resuspendió en 1 mL de medio DMEM.

9. Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del medio con las células fue transferida a un tubo eppendorf con 90  $\mu\text{L}$  de una solución de azul tripano al 1% disuelto en PBS. Esta solución fue homogenizada con una micropipeta.
10. 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla fueron tomados con ayuda de una micropipeta y colocados en una cámara de Neubauer.
11. Se observó al microscopio y se contaron las células viables (brillantes, refringentes, no coloreadas) contenidas en los cuatro cuadrantes como se muestra en la siguiente figura 1:



Figura 1. Cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para realizar el conteo celular, la cámara de Neubauer se divide en cuatro cuadrantes. Todas las células que se encuentren dentro de este cuadrante deberán ser contadas para obtener el número total.

12. Una vez contadas todas las células viables, se obtuvo el promedio del número de células que hay en la cámara de Neubauer sumando el total de células que hay en los cuatro cuadrantes y dividiéndolo entre cuatro.
13. El número total de células contenida en el mL de medio se obtuvo utilizando la siguiente formula:

Promedio de los 4 cuadrantes (Vol. de suspensión) (factor de dilución de la cámara)

14. Una vez calculado el número total de células, se ajustó el número total de células a 10 000 células/pozo.
15. En la placa de 96 pozos se sembraron 200  $\mu$ L del medio con las células.
16. 24 h después, se realizó el ensayo de viabilidad celular.

## 12. Figuras suplementarias

N-CNSs ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 Horas	48 Horas	72 horas
CTL			
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			

Figura suplementaria A. Micrografías tomadas en campo claro a un aumento de 20X de astrocitos tratados con diferentes concentraciones de N-CNSs a durante 24,48 y 72 h.

N-CNSs ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 Horas	48 Horas	72 horas
CTL			
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			

Figura suplementaria B. Micrografías tomadas en campo claro a un aumento de 20X de células de glioma maligno C6 tratadas con diferentes concentraciones de N-CNSs a durante 24,48 y 72 h.

N-CNSs ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 Horas	48 Horas	72 horas
CTL			
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			

Figura suplementaria C. Micrografías tomadas en campo claro a un aumento de 20X de células de glioma RG2 tratadas con diferentes concentraciones de N-CNSs a durante 24,48 y 72 h.

N-CNSs ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 Horas	48 Horas	72 horas
CTL			
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			

Figura suplementaria D. Micrografías tomadas en campo claro a un aumento de 20X de células de glioma humano U87 tratadas con diferentes concentraciones de N-CNSs a durante 24,48 y 72 h.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00135

Matrícula: 2181801429

Citotoxicidad inducida por nano-estructuras de carbono tipo esponjas en un modelo de Glioblastoma

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 10 del mes de febrero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA  
DRA. DINORAH FABIOLA GONZALEZ ESQUIVEL  
DR. MARIO OROZCO MORALES  
DRA. VERONICA PEREZ DE LA CRUZ



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALELI JANET SALAZAR RAMIRO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

ALELI JANET SALAZAR RAMIRO  
ALUMNA

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

  
DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA

VOCAL

  
DRA. DINORAH FABIOLA GONZALEZ  
ESQUIVEL

VOCAL

  
DR. MARIO OROZCO MORALES

SECRETARIA

  
DRA. VERONICA PEREZ DE LA CRUZ