

EVALUACIÓN *IN VITRO*, DE LA TOXICIDAD Y EFECTO CITOPROTECTOR DE LOS NANOTUBOS DE CARBÓN Y ÓXIDO DE GRAFENO CON SUPERFICIES MODIFICADAS, EN LAS CÉLULAS GLIALES EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDATIVO

A.M. Solano-Sánchez; J.J. Otero-Negrete; F. Tristán y C. Sámano-Salazar

Departamento de Ciencias Naturales-DCNI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Avenida Vasco de Quiroga 4871, 05348. Colonia Santa Fe Cuajimalpa, D.F., México

Resumen— En diferentes enfermedades neurodegenerativas, el estrés oxidativo afecta directamente a las neuronas y/o células gliales, lo que provoca un déficit en la actividad del sistema nervioso. Hasta ahora, las terapias antioxidantes no han mostrado un eficiente efecto neuroprotector. Dentro de las propuestas terapéuticas más recientes, se encuentran los nanotubos de carbono; debido a sus propiedades físicas y químicas. En el presente trabajo, se evalúa la citotoxicidad y el posible efecto protector de las nanoestructuras de carbono, mediante la combinación de las propiedades fisicoquímicas de las nanoestructuras dopadas con nitrógeno y funcionalizadas con grupos amino y ácidos carboxílicos en la línea C6 de células gliales en cultivo, expuestas a estrés oxidativo. Los resultados muestran que las nanoestructuras de carbón funcionalizadas con grupos amino parecen ser más tóxicas con respecto a las funcionalizadas con grupos carboxílicos. Además al co-aplicarlos con el factor inductor de estrés oxidativo (H_2O_2 o ácido ascórbico+ $Cu(NO_3)_2$), más del 60% de las células continúan siendo viables; indicando que los nanotubos actúan inhibiendo el efecto tóxico inducido en el cultivo celular. Esto sugiere la posibilidad de considerarlos como reductores potenciales de estrés oxidativo; y como posible aplicación complementaria con otras terapias para algunas enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave— Nanoestructuras de carbono, neuroprotección, células gliales.

I. INTRODUCCIÓN

En diferentes enfermedades neurodegenerativas, se genera un desbalance bioquímico que tiene como consecuencia una cascada de eventos secundarios que pueden afectar la conectividad en las redes neuronales o incluso inducir la muerte de las células nerviosas. Uno de los eventos tóxicos que se producen es el estrés oxidativo ocasionado, por la liberación excesiva del neurotransmisor excitador glutamato, que induce la sobreproducción de radicales libres, disfunción mitocondrial y la liberación de citocromo C. Durante este fenómeno las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) alteran directamente la estructura y función celular, teniendo como destino final en la cascada bioquímica la liberación y activación de inductores apoptóticos [1]. Se ha considerado que el bloqueo de algunos de estos factores pudiera constituir un enfoque terapéutico prometedor en las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC).

Desafortunadamente, las terapias antioxidantes que existen no protegen del todo a las células nerviosas. Recientemente, los nanotubos de carbono han tenido gran auge en el área biomédica, específicamente los nanotubos de pared múltiple (MWCNT, *por sus siglas en inglés*), ya que se ha reportado que tienen la capacidad de modificar positivamente la conectividad neuronal [2] así como de capturar y eliminar del medio radicales hidroxilos (OH) en ensayos *in vitro* [3]. Por esta razón se ha considerado que pudieran tener alguna aplicación biológica y/o terapéutica en enfermedades neurodegenerativas donde hay sobreproducción de ROS. Cabe señalar que dichas funciones terapéuticas dependerán de las características morfológicas y fisicoquímicas individuales de los nanotubos, que son determinadas en su proceso de síntesis [4] y la interacción con algunas terapias farmacológicas existentes [5].

En el presente trabajo se tiene por objetivo estudiar el efecto tóxico y posiblemente neuroprotector de los nanotubos de carbono con superficies modificadas y del óxido de grafeno (GO) en células gliales dañadas con un factor inductor de estrés oxidativo. Ambos materiales son buenos candidatos para aplicaciones biomédicas [6], esto se debe a sus propiedades fisicoquímicas, tales como: *flexibilidad, conductividad, disponibilidad del área superficial y biocompatibilidad*. Dicha biocompatibilidad se consigue mediante la funcionalización covalente o supramolecular de la superficie de las nanoestructuras de carbono con grupos amino o ácidos carboxílicos que facilitan su interacción con diversas biomoléculas [7].

II. METODOLOGÍA

Funcionalización y caracterización de los nanotubos de carbón y del óxido de grafeno

Los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno fueron sintetizados por deposición química de vapor (CVD) por el método descrito por Carrero-Sánchez *et al.* [8] Posteriormente se llevó a cabo una funcionalización supramolecular utilizando polielectrolitos como el ácido poliácrico (PAA, Sigma-Aldrich Mw ~ 100,000) y la polietilenimina ramificada (PEI, Sigma-Aldrich Mw ~25,000). Por otra parte el óxido de grafeno (GO) se obtuvo por el método de Hummers modificado [9] a partir de grafito natural. El GO obtenido se hizo reaccionar con ácido

tricloroacético (Sigma-Aldrich) en un medio altamente básico (pH=12) para convertir todos los grupos epoxi y los grupos hidroxilos en grupos carboxílicos y homogeneizar los grupos sustituyentes en el GO. Para reducir el tamaño y obtener dimensiones diferentes en las hojas de GO, éste se sometió a diferentes tiempos de sonicación. Finalmente los materiales de GO obtenidos se funcionalizaron en forma covalente con polietilenglicol diamina (PEG-NH₂, Sigma-Aldrich Mw ~ 2000) a través de una reacción de amidación. Todos los reactivos utilizados para la síntesis de las nanoestructuras de carbono así como los reactivos utilizados en la funcionalización de los mismos se utilizaron sin ninguna modificación o purificación adicional. La funcionalización del material se verificó mediante las técnicas de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR: Perkin-Elmer) y los cambios en el potencial zeta en la superficie de los materiales funcionalizados (Zetasizer: Nano ZS90, Malvern). Al finalizar, las muestras se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM: JSM-7000F, JEOL).

Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

La determinación de la citotoxicidad se llevó a cabo en células la línea C6 de astrogliá, proveniente de glioma de rata (pasaje 22) (ATCC[®], The Global Bioresource Center). Las células se sembraron en una microplaca de ELISA de 96 pozos a razón de 2 x 10⁴ por pozo, y con medio compuesto por F12 Ham, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO[®]) (1:1), enriquecido con 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL[®]), con 100 UI/mL de antibióticos (penicilina y estreptomycin, GIBCO-BRL[®]), e incubación a 37°C en una atmósfera compuesta por 95% de aire, 5% de CO₂ y humedad relativa de casi 100% por 24 horas.

En el primer protocolo las células fueron incubadas en medio de cultivo conteniendo por separado los nanotubos a una concentración de 20 µg/mL de MWCNT, MWCNT-PEI, MWCNT-PAA, GO-PEG-NH₂, el H₂O₂ (50, 100 o 200 µM; Sigma-Aldrich[®]) o el ácido ascórbico + CU(NO₃)₂. La exposición de las células de los nanotubos o al H₂O₂ fue de 24 horas, mientras que al ácido ascórbico + CU(NO₃)₂ sólo por 30 minutos. El segundo protocolo consistió en co-aplicar en las células los nanotubos + H₂O₂ por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo con los nanotubos y H₂O₂ y se lavaron tres veces por 5 minutos con una solución amortiguadora al 1x (Phosphate Buffered Saline, PBS; por sus siglas en inglés) por 10 min. Al concluir los lavados, se añadieron 10 µL del reactivo WST-1 "Cell proliferation reagent" de Roche[®] para evaluar la viabilidad celular, y se incubaron 2 horas. Finalmente, se realizó la lectura de las absorbancias a 440 nm, en un lector de placas de ELISA Tecan operado por el programa computacional i-control. Al finalizar los datos se analizaron estadísticamente en el programa Origin Pro 9.0[®]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con 3 réplicas cada uno.

III. RESULTADOS

Los espectros infrarrojos de las muestras MWCNT-PAA, MWCNT-PEI y GO-PEG-NH₂, presentan bandas que confirman la funcionalización con los diferentes polímeros. Por ejemplo alrededor de 1200 cm⁻¹ se presenta el estiramiento C-N y alrededor de 700 el meneo N-H (aminas primarias y secundarias) en las nanoestructuras funcionalizadas con grupos amino. En el caso de las estructuras con grupos ácido carboxílico, se presentan las bandas de estiramiento O-H entre 3300-2500 cm⁻¹, los estiramientos de C=O alrededor entre 1800 -1500 cm⁻¹, así como los estiramientos del enlace C-O entre 1400-1200 cm⁻¹. También se observan los estiramientos C-C de los anillos bencénicos que conforman la red grafitica de las nanoestructuras de carbono alrededor de 1500 cm⁻¹. Además bandas características que confirman la presencia de los polímeros se observan entre 3000 – 2700 cm⁻¹ (Figuras 1 y 2).

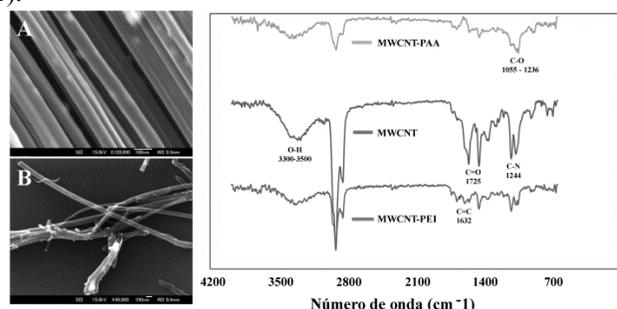


Figura 1. Micrografías capturadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectro infrarrojo y de MWCNT, MWCNT funcionalizados. Del lado izquierdo se muestran dos micrografías en las cuales se observan la morfología que sufren los nanotubos de carbono antes y después de funcionalizar (A) MWCNT (B) MWCNT-PEI. Del lado derecho se muestra el espectro IRTF de MWCNT, MWCNT-PEI y MWCNT-PAA, en el cual se presenta una banda característica del enlace sencillo C-C, presente en el polielectrolito PEI a 1244cm⁻¹. Mientras que a 1632cm⁻¹ se presenta la banda de los enlaces dobles entre C-C de las nanoestructuras de carbono, finalmente los enlaces C=O a 1725cm⁻¹. Barras de calibración y aumentos: 100 nm (A y B); 120,000 X (A) y 40.000 X (B).

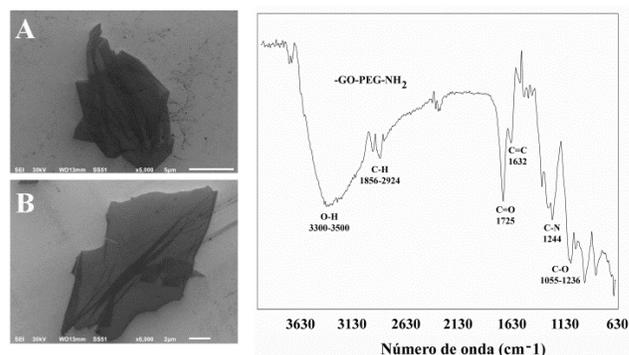


Figura 2. Micrografía por MEB y espectro infrarrojo de óxido de grafeno (GO) funcionalizado con PEG-NH₂. En la parte izquierda se presenta una micrografía de GO donde se observan hojas de dimensiones irregulares (A) y (B). Del lado derecho se presenta el espectro IRTF de GO-PEG-NH₂, con una banda característica del enlace C-N a 1244cm⁻¹ a 1632cm⁻¹ el enlace C=C y a 1725 el enlace C=O, los cuales son propios del GO. Barras de calibración y aumentos: 5 µm; 5.000 X (A) y 2µm; 6.000 X (B).

Adicionalmente, se realizó una prueba de la funcionalización donde el cambio en el potencial zeta de las muestras, que fue negativo para MWCNT-PAA (-51.7eV) y positiva para la muestra MWCNT-PEI (+7.92eV), debido a los grupos funcionales presentes en las moléculas unidas a los nanoestructuras de carbono.

En las pruebas biológicas, primero exploramos la viabilidad celular ante la exposición de los nanotubos *per se* en el cultivo de células gliales; y encontramos que tanto las nanoestructuras de carbón funcionalizadas con aminos (MWCNT-PEI) y grupos carboxílicos (MWCNT-PAA), como las láminas de GO (GOG y GOCH) generan cierta toxicidad celular con respecto a los no funcionalizados (Figuras 3 y 4).

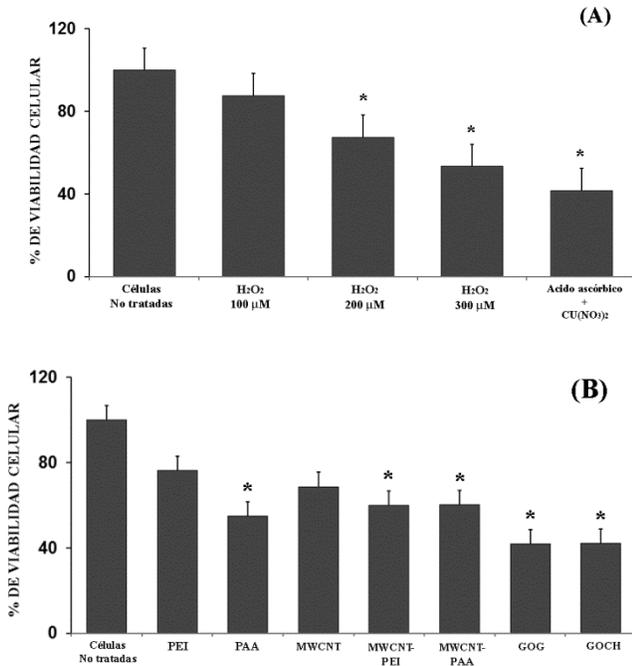


Figura 3. Gráficas que presentan el porcentaje de viabilidad celular, después de la exposición de los factores tóxicos H₂O₂ o ácido ascórbico+Cu(NO₃)₂, los polielectrolitos, MWCNT, MWCNT y GO funcionalizados. En (A) se observa la reducción en el porcentaje de las células viables expuestas a las diferentes concentraciones de H₂O₂ y al ácido ascórbico + Cu(NO₃)₂ con respecto a las células no tratadas. En (B) se muestra el porcentaje de células viables después de incubarlas con sólo los nanotubos a una concentración de 20 μg/ml. Se puede observar que PAA, MWCNT-PEI, MWCNT-PAA, GOG Y GOCH, mostraron cierta toxicidad con respecto a las células no tratadas. Promedio de tres experimentos realizados por triplicado (*P<0.01).

Posteriormente, determinamos la concentración necesaria para inducir estrés oxidativo moderado en las células gliales en cultivo, a través de la aplicación del H₂O₂ y ácido ascórbico + Cu(NO₃)₂. Encontramos que para inducir gliotoxicidad moderada fue necesario aplicar concentraciones de 100, 200 o 300 μM de H₂O₂ por 24 horas, donde el porcentaje de las células viables se redujo

aproximadamente 87, 67 y 53% respectivamente. Mientras que en los experimentos en los cuales se aplicó ácido ascórbico + Cu(NO₃)₂ por 30 minutos, se encontró que la viabilidad celular se redujo al 28% con respecto a las células no tratadas(Figura 3).

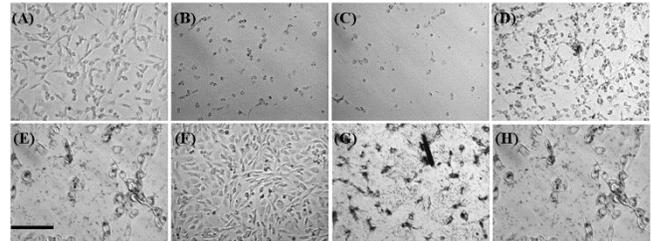


Figura 4. Micrografías capturadas por microscopía de luz en campo claro. Se muestran algunos ejemplos de las células sin tratamiento (A), expuestas al factor tóxico H₂O₂ 100 y 200μM, respectivamente (B-) y a sólo los nanotubos de carbón (D) MWCNT; (E) PAA; (F) PEI; (G) MWCNT-PAA; (H) MWCNT-PEI. Barra de calibración y aumento: 100μm; 20 X.

En los experimentos de co-aplicación de los nanotubos + H₂O₂ por 24 horas y nanotubos + Cu(NO₃)₂ por 30 minutos, encontramos que el porcentaje de las células viables incrementó significativamente, y representa aproximadamente el 55 y 47% con respecto a las células expuestas a sólo el H₂O₂ o ácido ascórbico + Cu(NO₃)₂ (Figura 5).

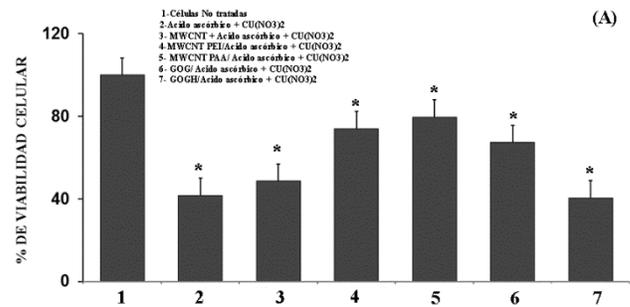


Figura 5. Gráficas que presentan el porcentaje de viabilidad celular, después de la co-aplicación del ácido ascórbico+Cu(NO₃)₂, los nanotubos MWCNT y GO funcionalizados. Se puede observar que el porcentaje de células viables incrementó en todos los casos en los se co-aplicó el ácido ascórbico+Cu(NO₃)₂+ los nanotubos. Promedio de tres experimentos realizados por triplicado (*P<0.01).

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó el efecto tóxico que pudieran inducir *per se* los nanotubos de carbono y el óxido de grafeno con superficies modificadas. Así como explorar el posible papel neuroprotector de los nanotubos en un cultivo de células gliales, en las cuales se indujo gliotoxicidad, a través de dos factores inductores de estrés oxidativo. Contrario a lo que esperábamos los nanotubos funcionalizados presentaron toxicidad en el cultivo celular, con respecto a los no funcionalizados. Es posible que dicha toxicidad se deba a la acumulación y/o precipitación de las nanoestructuras en el medio del cultivo celular, limitando la

liberación de factores tróficos necesarios para el crecimiento y proliferación celular, así como la concentración de los nanotubos utilizada en la línea celular C6 (20 µg/ml), aunado a la interacción negativa con los componentes del medio de cultivo; lo que implicaría que las células presenten un proceso de vacuolización [10], inhibiendo la proliferación celular y como consecuencia final la muerte celular. Por otro lado, tal y como se ha descrito en otra línea celular el GO es posible que difunda al interior de la célula [11], acumulándose e interactuando con otras biomoléculas, lo cual generaría cambios que pudieran alterar el ciclo celular. Sin embargo, aún falta por determinar el tipo de interacción que presentan las nanoestructuras de carbón con diferentes componentes celulares. Al realizar los experimentos de co-aplicación, observamos que el porcentaje de las células viables incrementó considerablemente con respecto a las células tratadas con cualquiera de los dos factores generadores de estrés oxidativo. Esto confirma la capacidad de los nanotubos para captar los radicales hidroxilos (OH⁻) y superóxido (O₂⁻) [3] y hacer menos tóxico el medio que rodea a las células. Estos resultados nos pudieran indicar que los nanotubos de carbón y el óxido de grafeno con superficies modificadas pudieran fungir como posibles terapias alternas o bien complementar las existentes, con la finalidad de reducir el ambiente tóxico que se genera debido al estrés oxidativo en diferentes enfermedades neurodegenerativas [1]. Sin embargo, aún faltan varios estudios para confirmar dicha propuesta.

V. CONCLUSIONES

Concluimos que para lograr una buena dispersión de los nanotubos en el medio se requiere de la funcionalización de la superficie de las nanoestructuras de carbono. Cabe mencionar que los MWNT sin funcionalizar, sólo con dopaje con nitrógeno son menos citotóxicos que aquellas nanoestructuras funcionalizadas con aminas. Por otro lado, determinamos la concentración necesaria para inducir gliotoxicidad moderada con H₂O₂ o con ácido ascórbico + CU(NO₃)₂ en las células gliales en cultivo, lo cual buscaremos revertir a través de las nanoestructuras de carbono menos citotóxicas. Finalmente, es necesario mencionar que aún faltan diversos estudios por realizar para determinar la interacción de las nanoestructuras a nivel celular, así como su posible aplicación biomédica e interacción con algunos fármacos.

RECONOCIMIENTOS

El autor F. Tristán agradece proyecto de ciencia básica de CONACYT con número 237215 y al proyecto de la DSA-SEP con clave 47310424. La autora C. Salazar-Sámamo agradece al proyecto la DSA-SEP con clave 47310420.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Uttara, V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan, "Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options", *Curr Neuropharmacol*, vol. 7 no. 1, pp. 65–74, Mar. 2009.
- [2] G. Cellot, E. Cilia, S. Cipollone, V. Rancic, A. Sucapane, S. Giordani, L. Gambazzi, H. Markram, M. Grandolfo, D. Scaini, F. Gelain, L. Casalis, M. Prato, M. Giugliano, L. Ballerini, "Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts", *Nature Nanotechnology*, vol. 4, pp. 126 – 133, Dec. 2008.
- [3] S. Tsuruoka, K. Takeuchi, K. Koyama, T. Noguchi, M. Endo, F. Tristan, M. Terrones, H. Matsumoto, N. Saito, Y. Usui, D. W. Porter, V. Castranova "ROS evaluation for a series of CNTs and their derivatives using an ESR method with DMPO," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 429, 012029, 2013.
- [4] S. Fiorito, A. Serafino, F. Andreola, A. Togna, G. Togna. "Toxicity and Biocompatibility of Carbon Nano- particles," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, no. 3, pp. 591-599, Mar. 2006.
- [5] A. Bianco, K. Kostarelos, C. D. Partidos, M. Prato, "Applications of carbon nanotubes in drug delivery," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 9, no. 6, pp. 674-679, Dec. 2005.
- [6] A. Bianco, K. Kostarelos, C. D. Partidos, M. Prato, "Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes," *Chemical Communications*, pp. 571-577, 2005
- [7] S. K. Singh, M. K. Singh, P. P. Kulkarni, V. K. Sonkar, J. J. A. Grácio, D. Dash. "Amine-modified graphene: Thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications," *ACS Nano.*, vol. 6 no. 3, pp 2731–2740, Feb. 2012.
- [8] J. C. Carrero-Sánchez, A. L. Elías, R. Mancilla, G. Arrellín, H. Terrones, J. P. Laclette, and M. Terrones, "Biocompatibility and Toxicological Studies of Carbon Nanotubes Doped with Nitrogen," *Nano Letters*, vol. 6, no. 8, pp 1609–1616, Jul. 2006.
- [9] L. Shahriary and A.A. Athawale, "Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach," *International Journal of Renewable Energy and Environmental Engineering*, vol. 2, no.1, pp. 58-63, Jan. 2014.
- [10] T. Aki, A. Nara, K. Uemura. "Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances", *Cell Biol Toxicol*, vol. 28 no. 3 pp. 125-131, Jan. 2012.
- [11] Y. Lee, J. Choi, W. Wang, S. Lee, T. Nam, W. Choi. C. Kim, J. Lee, S. Kim, S.Kang, D. Khang.

“Nullifying Tumor Efflux by Prolonged Endolysosome Vesicles: Development of Low Dose Anticancer-Carbon Nanotube Drug”, ACS Nano, vol. 7, no. 10, pp. 8484-97 Oct. 2013.