

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 047**

21 Número de solicitud: 202130721

51 Int. Cl.:

C01B 32/182 (2007.01)

C08L 33/20 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

26.07.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.01.2023

Fecha de concesión:

07.09.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.09.2023

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
MARQUÉS DE VALDECILLA (50.0%)
Avenida Cardenal Herrera Oria s/n
39011 Santander (Cantabria) ES y
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

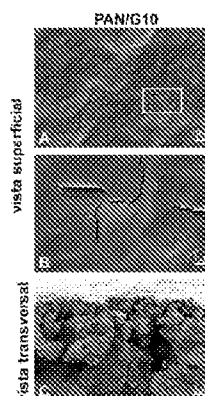
**TAPIA MARTÍNEZ, Olga y
DIBAN GÓMEZ, Nazely**

54 Título: **Material compuesto de poliacrilonitrilo y nanoplaquetas de grafeno, procedimiento de obtención y uso como sustrato de cultivos *in vitro* de células cancerosas**

57 Resumen:

Material compuesto de poliacrilonitrilo y nanoplaquetas de grafeno, procedimiento de obtención y uso como sustrato de cultivos *in vitro* de células cancerosas. La presente invención se refiere a un material compuesto en forma de membrana que consiste en un polímero biocompatible de poliacrilonitrilo y una pluralidad de nanoplaquetas de grafeno, donde dichas nanoplaquetas de grafeno están distribuidas de forma aleatoria sobre el poliacrilonitrilo formando agrupaciones. Además, la presente invención se refiere a su procedimiento de obtención y a su uso como sustrato o andamiaje de cultivos *in vitro* de células cancerosas.

Fig. 1



ES 2 933 047 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Material compuesto de poliacrilonitrilo y nanoplaquetas de grafeno, procedimiento de obtención y uso como sustrato de cultivos *in vitro* de células cancerosas

5 La presente invención se refiere a un material compuesto en forma de membrana que consiste en un polímero biocompatible de poliacrilonitrilo y una pluralidad de nanoplaquetas de grafeno, donde dichas nanoplaquetas de grafeno están distribuidas de forma aleatoria sobre el poliacrilonitrilo formando agrupaciones. Además, la presente invención se refiere a su
 10 procedimiento de obtención y a su uso como sustrato o andamiaje de cultivos *in vitro* de células cancerosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los cánceres sólidos se caracterizan por una desregulación de la proliferación celular y el potencial metastásico de las células cancerosas del tumor primario para invadir y extenderse a otros órganos del cuerpo. La proliferación celular anormal de las células cancerosas depende de una desregulación del ciclo celular, especialmente de la transición de la fase G1-S, producida por la expresión alterada de oncogenes (up-regulation) y genes supresores de
 20 tumores (down-regulation) implicados en el control del ciclo celular.

En la capacidad de las células cancerosas de migrar e invadir a través de la matriz extracelular para establecer tumores secundarios metastásicos intervienen diferentes mecanismos. Entre ellos se encuentran

- 25 i) la pérdida de las interacciones celulares características de las células epiteliales, principalmente las uniones adherentes, como resultado, por ejemplo, del silenciamiento epigenético de la expresión del gen E-Cadherina,
- ii) la expresión alterada de integrinas que desestabiliza las interacciones célula-matriz celular,
- 30 iii) el aumento de la expresión de metaloproteasas que facilita la migración ameboide de las células cancerosas a través de la matriz extracelular, y
- iv) la desregulación de la dinámica de la actina dependiente de la vía Rho/Rho (ROCK), que repercute en la polimerización y la contractilidad de la actina. Es importante destacar que este último mecanismo es necesario para la migración e invasión de las
 35 células cancerosas. De hecho, las células cancerosas sufren cambios tanto en la

forma de la célula, lo que implica la formación de protuberancias e invadosomas basados en la actina, como en la contractilidad de la actomiosina, que es necesaria para la retracción y translocación de los cuerpos celulares tumorales.

- 5 Sobre la base de las propiedades de las células cancerosas, se utilizan dos enfoques estratégicos principales en el tratamiento del cáncer sólido:
- los antiproliferativos, dirigidos a eliminar las células cancerosas de alta proliferación,
 - y los centrados en los procesos celulares relacionados con la capacidad de las células tumorales malignas para migrar, invadir y hacer metástasis.

10 La nanoterapéutica del cáncer (nanotecnología para el diagnóstico y la terapia del cáncer) ha sido impulsada como una alternativa prometedora para tratar las Células Madre del Cáncer (CSC), que han sido responsables de la mayor parte de la recurrencia del cáncer y son particularmente resistentes a las radio y quimioterapias [R. Misra, S. Kandoi, S. Varadaraj, S. Vijayalakshmi, A. Nanda, R.S. Verma, Nanotheranostics: A tactic for cancer stem cells prognosis and management, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 55 (2020) 101457].

20 Como ejemplo, se ha demostrado que los materiales compuestos de grafeno y óxido de grafeno tienen notables propiedades fisicoquímicas y compatibilidad biológica, para el tratamiento eficaz del cáncer de glioblastoma [C. Martelli, A. King, T. Simon, G. Giamas, Graphene-Induced Transdifferentiation of Cancer Stem Cells as a Therapeutic Strategy against Glioblastoma, ACS Biomater. Sci. Eng. 6 (2020) 3258–3269].

25 También se ha demostrado que, cuando se ponen células cancerosas en contacto con dispersiones acuosas de láminas delgadas de grafeno prístino u óxido de grafeno, se produce una inhibición migratoria de las células cancerosas y un deterioro de la actividad mitocondrial normal y los ciclos de ATP [H. Zhou, B. Zhang, J. Zheng, M. Yu, T. Zhou, K. Zhao, Y. Jia, X. Gao, C. Chen, T. Wei, The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration, Biomaterials. 35 (2014) 1597–1607].

30 Además, los tratamientos anticancerígenos que utilizan nanomateriales basados en carbono pueden modular los microambientes tumorales con características que incluyen el aumento de la permeabilidad y la retención, la acidosis, la angiogénesis extensa y las células inmunitarias asociadas al tumor [J. Saleem, L. Wang, C. Chen, Carbon-Based Nanomaterials

for Cancer Therapy via Targeting Tumor Microenvironment, Adv. Healthc. Mater. 7 (2018) 1–30].

Por otro lado, se pueden localizar en la bibliografía estudios sobre membranas compuestas (PCL/GbN) de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) que comprenden concentraciones reducidas de nanomateriales basados en grafeno (GbN) distribuidos homogéneamente en PCL que han demostrado una diferenciación neuronal inductiva.[S. Sánchez-González, N. Diban, F. Bianchi, H. Ye, A. Urtiaga, Evidences of the Effect of GO and rGO in PCL Membranes on the Differentiation and Maturation of Human Neural Progenitor Cells, Macromol. Biosci. 18 (2018) 1–8.; M. Mantecón-Oria, N. Diban, M.T. Berciano, M.J. Rivero, O. David, M. Lafarga, O. Tapia, A. Urtiaga, Hollow fiber membranes of PCL and PCL/graphene as scaffolds with potential to develop in vitro blood– brain barrier models, Membranes (Basel). 10 (2020) 1–18].

Es importante destacar que la mayor parte de la morbilidad y mortalidad en el cáncer sólido se basa en la invasión y la metástasis, que representan más del 90% de la mortalidad. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes antiproliferativos que produzcan la contracción del tumor, y/o nuevos fármacos inhibidores del potencial migratorio, ya que interfieren en la capacidad de las células cancerosas para migrar y metastatizar, y que pueden proporcionar nuevas opciones terapéuticas para los cánceres sólidos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material compuesto en forma de membrana plana (a partir de aquí “el material compuesto de la invención”) caracterizado por que consiste en

- un polímero biocompatible de poliacrilonitrilo en forma de membrana plana de espesor de entre 198 μm y 208 μm y
- una pluralidad de nanoplaquetas de grafeno,
 - donde las nanoplaquetas de grafeno están en un porcentaje en peso de entre un 33 % y un 60 % en el material compuesto, preferiblemente en un 50 %,
 - donde las nanoplaquetas de grafeno se localizan en la superficie de polímero biocompatible de poliacrilonitrilo formando agrupaciones de nanoplaquetas de grafeno de forma aleatoria,
- donde la fracción de poros en la superficie del material compuesto oscila entre 1,1 %

y 2,3 %,

- y donde la fracción de poros en la sección transversal del material compuesto oscila entre 15,2 % y 20,2 %.

5 El término “polímero biocompatible” se utiliza en la presente invención para hacer referencia a un polímero capaz de estar en contacto con tejidos u organismos vivos sin causar daño al tejido vivo o al organismo. Se trata, por tanto, de un polímero que no produce una respuesta tóxica, perjudicial o inmunológica en el tejido vivo u organismo. En la presente invención el polímero biocompatible es poliacrilonitrilo, que se encuentra en forma de membrana plana de
10 espesor de entre 198 μm y 208 μm .

En el material compuesto de la presente invención las nanoplaquetas de grafeno están compuestas de grafito exfoliado con entre 5 y 10 capas. Las nanoplaquetas de grafeno no se distribuyen homogéneamente en la superficie del poliacrilonitrilo. Se sitúan formando
15 agrupaciones o agregaciones de nanoplaquetas de grafeno aleatoriamente sobre la superficie del poliacrilonitrilo.

En la presente invención las nanoplaquetas de grafeno están en un porcentaje en peso de entre un 33 % y un 60 % en el material compuesto, preferiblemente en un 50 %.

20 La superficie del material compuesto es porosa y está agrietada. La fracción de poros en la superficie y en la sección transversal del material compuesto de la presente invención se determina mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, EVO MA 15, Carl Zeiss) a una tensión de 20 kV. En el material compuesto de la invención

- 25
- la fracción de poros en la superficie del material compuesto es de entre 1,1 % y 2,3 %
y
 - la fracción de poros en la sección transversal del material compuesto es de entre 15,2 % y 20,2 %.

30 La naturaleza del material compuesto en forma de membrana plana de la presente invención es hidrofílica. El término “hidrófilo” es un término conocido en el estado de la técnica y se refiere a un compuesto o material compuesto que tiene afinidad con el agua y que la absorbe o se disuelve fácilmente en ella. El material compuesto de la invención presenta un ángulo de contacto con el agua de entre 65 ° y 67 °. Dicha naturaleza hidrofílica del material compuesto

de la presente invención supone una ventaja para la adsorción de las proteínas (proteínas extracelulares globulares y glicoproteínas) de cultivos celulares.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del material compuesto de la presente invención (a partir de aquí “el procedimiento de la invención”) caracterizado por que se lleva a cabo mediante el método de inversión de fases.

En una realización preferida de la presente invención el procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas:

- a) dispersar nanoplaquetas de grafeno en un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona (NMP), Dimetilacetamida (DMAc) y una combinación de los mismos, por sonicación,
- b) añadir poliacrilonitrilo sobre la dispersión de nanoplaquetas de grafeno obtenida en la etapa (a) y agitar para obtener una solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno homogénea, donde el porcentaje en peso de las nanoplaquetas de grafeno en la solución es de entre 5 % y 15 % en peso, preferiblemente del 10 % en peso,
- c) desgasificar la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno durante un periodo de tiempo de entre 8 h y 24 h a temperatura ambiente,
- d) extender la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno obtenida en la etapa (c) sobre una placa de vidrio, preferiblemente con la ayuda de una cuchilla de extendido,
- e) sumergir la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno desgasificada obtenida en la etapa (d) en un primer baño de coagulación que comprende
 - agua y/o
 - un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona (NMP), Dimetilacetamida (DMAc) y una combinación de los mismos,
- y f) eliminar los restos de disolvente del producto obtenido en la etapa (e) en un segundo baño de agua, preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos 48 h.

En la presente invención se entiende por temperatura ambiente a una temperatura de entre 18 °C y 22 °C.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, el primer baño de

coagulación de la etapa (e) comprende

- agua y
- un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona, Dimetilacetamida y una combinación de los mismos,

5

Más preferiblemente el porcentaje en volumen el primer baño de coagulación de la etapa (e) es de 80 % de agua y 20 % de un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona, Dimetilacetamida y una combinación de los mismos.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material compuesto de la invención como sustrato o andamiaje para el cultivo *in vitro* de células cancerosas, para desarrollar modelos experimentales útiles para estudios *in vitro* del comportamiento celular en diferentes sistemas biológicos, por ejemplo, los mecanismos implicados en la diferenciación celular. Para ello se
 15 ponen en contacto las células cancerosas con el material compuesto de la invención en un cultivo *in vitro* donde dichas células cancerosas se fijan en las agrupaciones de nanoplaquetas de grafeno del material compuesto. Preferentemente las células cancerosas provienen de células de cánceres sólidos extraídas de un sujeto que padece cáncer.

En la presente invención el término “sujeto” es equivalente al término “individuo”; por lo que
 20 ambos términos pueden emplearse indistintamente en la presente invención. Se entiende por “sujeto”, además de cualquier individuo, cualquier animal perteneciente a cualquier especie. Ejemplos de sujetos incluyen, sin limitarse a, animales de interés comercial tales como aves (gallinas, avestruces, pollos, ocas, perdices, etc.); conejos; liebres; animales domésticos (perros, gatos, etc.); ganado ovino; ganado caprino (cabras, etc.); ganado porcino (jabalíes,
 25 cerdos, etc.); ganado equino (caballos, ponis, etc.); ganado vacuno o bovino (toros, vacas, bueyes, etc.); animales de interés cinegético, tales como ciervos, venados, renos, etc.; y los seres humanos. No obstante, en una realización particular, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, el mamífero es un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

30 Más preferiblemente las células cancerosas provienen de células de cáncer de mama. A nivel traslacional, el material compuesto de la presente invención serviría de terapia personalizada para conocer en 24h si se induce en las células tumorales del sujeto que padece cáncer una transición mesénquima-epitelio (MET) y, en caso de un resultado positivo, se realizaría la implantación del material compuesto de la presente invención en el sujeto que padece cáncer

con el objetivo de inhibir la migración de las células desde el tumor a otros tejidos (metástasis) y/o la reformación del tumor. El material compuesto de la presente invención actuaría como agente "migrastático" o "inhibidor del potencial migratorio", es decir, interferiría en la capacidad de las células cancerosas para migrar y metastatizar, y por tanto inhibiría la actividad migratoria de células cancerosas, preferiblemente de células de cáncer de mama.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 Imágenes SEM de la superficie superior (A-B) y de la sección transversal (C) de las membranas PAN/G indicadas. Las imágenes de la superficie son a un aumento de x1000 (A) y x5000 (B) y las imágenes de la sección transversal son a x1000 (C). Barras de escala: 10µm (A) y 1µm (B-C).

Fig. 2 Comparación de los espectros Raman del grafeno, de las membranas PAN/G0 y PAN/G10.

Fig. 3 Cartografía de la superficie (0,144x0,088 mm) de la membrana PAN/G10 que muestra (A) la intensidad de la banda G del grafeno (I_G), (B) la relación de intensidad de las bandas D y G del grafeno (I_D/I_G), (C) la relación de intensidad de las bandas 2D y G del grafeno (I_{2D}/I_G) y (D) la relación de intensidad de la banda característica del nitrilo (-CN) del polímero PAN y la banda G del grafeno (I_{CN}/I_G).

Fig. 4 Valores medios del ángulo de contacto con el agua de las membranas PAN/G

Fig. 5 Gráficos de la permitividad dieléctrica relativa (A) y de la conductividad eléctrica (B) a diferentes valores de la frecuencia aplicada de las membranas PAN/G2; PAN/G10 y PAN/G15 medidos mediante impedancia eléctrica

Fig. 6 Imágenes de microscopía de fluorescencia de núcleos de células MCF7 (A-D) y NSC34 (F-I) teñidos con DAPI, un marcador citoquímico del ADN. Ambos tipos de células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio (A y F) o en membranas de PAN/G con cantidades crecientes de 0 %, 2 % y 10 % de grafeno (PAN/G0, (B, G); PAN/G2, (C, H); PAN/G10, (D, I). (E y J) El número total de células por unidad de superficie se calculó a partir de al menos tres imágenes diferentes tomadas de cultivos celulares MCF7 y NSC34, respectivamente. Las barras representan la media $\pm$ DE. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ***: $p < 0,0005$. Barra de escala: 50 μ m (A-I).

Fig. 7 Imágenes de microscopía confocal de células de origen tumoral MCF7 (cáncer de mama, A-B) y NSC34 (neuroblastoma, C-D) cultivadas en cubreobjetos de vidrio (Ctrl) o en membranas PAN/G10 y teñidas con faloidina conjugada con FITC para revelar la distribución de la F-actina. Mediante microscopía confocal también se comprobó el efecto del PAN/G10 sobre la morfología de otras líneas celulares de origen tumoral como son las SH-SY5Y (neuroblastoma, E-F), U87 (glioblastoma, G-H), C6 (glioma, I-J) y HeLa (cáncer de cérvix, K-L) de alta capacidad migratoria. Imágenes de microscopía confocal de células de origen no-tumoral como son los fibroblastos humanos (ASC52, M-N) y murinos (MEF, O-P) inmortalizados. Nótese como la morfología de las células no-tumorales no cambia según su sustrato de crecimiento sea Ctrl o PAN/G10. Barras de escala: 10 μ m (A-D), 20 μ m (G-P), 30 μ m (E-F).

Fig. 8 Análisis morfométrico de las células MCF7 y NSC34 2 días después del cultivo en cubreobjetos de vidrio (Ctrl) o en membranas PAN/G10. Se tomaron imágenes de fluorescencia de las células teñidas con Phalloidin-FITC y se midieron el área superficial (A) y el factor de forma (B) de al menos 50 células de cada grupo experimental. Las barras representan las medias $\pm$ DE. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ***: $p < 0,0005$, n.s: no significativo.

Fig. 9 (A) El ensayo de apoptosis se realizó mediante la tinción TUNEL de las células MCF7 cultivadas durante 2 días en cubreobjetos de vidrio (Ctrl) o (B) en membranas PAN/G10. Las células se tiñeron con DAPI y se calculó el porcentaje de células positivas a TUNEL (C). Las barras representan la media $\pm$ DE. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ***: $p < 0,0005$, n.s: no significativo. Barras de escala: 10 μ m.

Fig. 10 (A) Representación esquemática de los puntos A y B (separados por 70 μ m de distancia sobre la superficie de la membrana) y de las altitudes (con el enfoque del láser en

Z=0 μm que significa al nivel de la superficie de la membrana y en Z=15 μm sobre el nivel de la superficie de la membrana) donde se adquirieron los espectros Raman para una membrana PAN/G10 con racimos de MCF7 formados en la parte superior después de 2 días de cultivo celular. (B, C) Espectros Raman del punto A y B, respectivamente. (B) El espectro del punto A muestra una región de la superficie de la membrana (Z=0 μm) con una baja concentración de grafeno (banda G) en relación con el polímero (intensidad del pico CN). Las bandas características representativas de las biomoléculas presentes en las células no se detectan en Z=15 μm en el punto A. (C) El espectro del punto B en Z=0 μm es representativo de una región con alta aglomeración de grafeno (baja relación $I_{\text{CN}}/I_{\text{G}}$) donde, por el contrario, en Z=15 μm se apreciaban claramente las bandas típicas de las biomoléculas en las células.

Fig. 11 (A) Gráfico de puntos que compara la relación $I_{\text{CN}}/I_{\text{G}}$ de los espectros Raman del lote 1 (G desigual, gris claro) y del lote 2 (G uniforme, gris oscuro) de las membranas PAN/G10 tras un mapeo de la superficie de 0,144 x 0,088 mm, en el que se analizaron un mínimo de 30 puntos. La línea de cada gráfico de puntos representa la media. (B, D) Imágenes ópticas de la superficie de la membrana PAN/G10 del lote 1 (G desigual, B) y del lote 2 (G uniforme, D). (C, E) Imágenes confocal de células MCF7 después de 2 días de cultivo sobre membranas PAN/G10 del lote 1 (G desigual, C) y del lote 2 (G uniforme, E). ***: $p < 0.0005$. Barra de escala: 50 μm (C y E).

Fig. 12 Imágenes confocales que muestran los filamentos de actina (F-actina) del citoesqueleto de células MCF7 cultivadas en cubreobjetos de vidrio (A) Control 24h, o en membranas PAN/G10 durante 24 (B) o 72 h (C). Obsérvese la agregación celular inducida por PAN/G10 formando islotes celulares que crecen significativamente en tamaño con el tiempo (72 h). (D y E) Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia que muestran la expresión de E-cadherina en la membrana celular de las células de cáncer de mama MCF7 cultivadas en cubreobjetos de control (D) o en membranas PAN/G10 (E). Obsérvese el aumento de la señal de E-Cadherina en los bordes de las células MCF7 que forman islotes debido a la formación de uniones adherentes inducida por PAN/G10. Barra de escala: 15 μm

Fig. 13 (A) Reconstrucción tridimensional de imágenes de microscopio confocal de un islote celular MCF7 formado tras crecer sobre PAN/G10 durante 5 días y teñido conjuntamente con faloidina-FITC y DAPI. (B) La imagen se giró 90° respecto a la anterior (de arriba a abajo) para observar el crecimiento vertical del islote. (C) Galería de las imágenes utilizadas para la

reconstrucción 3D en A. Obsérvese que todas las vistas transversales del islote muestran una agregación celular compacta. Barra de escala: 30 μ m.

Fig. 14 Determinación por RT-qPCR de la expresión del gen ID1 en extractos de ARN de células MCF7 cultivadas en cubreobjetos de vidrio (Ctrl) o en membranas PAN/G10, según se indica. Las barras representan la media $\pm$ DE obtenida a partir de los datos de tres experimentos independientes.

Fig. 15 La imagen confocal muestra un detalle del borde celular de dos células teñidas conjuntamente para E-Cadherina y Phalloidin-FITC, para revelar la F-actina. Los gráficos representan el perfil lineal de las señales de intensidad de fluorescencia de E-Cadherina y F-actina en los puntos indicados (a, b) de la imagen. Obsérvese la co-localización y la intensidad similar de ambas señales, lo que indica la presencia de uniones adherentes intercelulares positivas para la E-cadherina, que normalmente están enriquecidas en filamentos de actina (F-actina).

Fig. 16 Análisis de Western blot que muestra la regulación al alza de la expresión de E-Cadherina en células MCF7 cultivadas en placas de Petri normales (Ctrl) o en membranas PAN/G10. La histona H3 se utilizó como control de carga. El aumento relativo de pliegues de E-Cadherina se calculó utilizando el software Image J.

Fig. 17 Determinación por RT-qPCR de la expresión del gen CDH en extractos de ARN de células MCF7 cultivadas en placas Petri (Ctrl) o en membranas PAN/G10, según se indica. Las barras representan las medias $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Fig. 18 Micrográficas electrónicas de transmisión de células MCF7 cultivadas en membranas PAN/G10. Obsérvese, en el panel J, el aspecto normal de los orgánulos celulares típicos, como las mitocondrias (Mi), el retículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi (Go), así como la ausencia de aglomeraciones de heterocromatina en el núcleo (Nu), de las células de tipo epitelial que forman islotes celulares. El detalle de mayor aumento en K, muestra una típica unión adherente intercelular (flechas). Barra de escala: 3 μ m (A) y 500 nm (B).

Fig. 19 Análisis de la migración de las células de cáncer de mama MCF7 mediante un ensayo de cicatrización de heridas utilizando placas de Petri de 35 mm con un inserto de 2 pocillos. (A-D) Imágenes de microscopía de lapso de tiempo del cierre de la herida de las células MCF7

que crecen en placas de cultivo (A, B, Control) o en membranas PAN/G10 (C, D) a las 0 h y 24 h después de la retirada del inserto de cultivo. Obsérvese en el panel B que las células MCF7 de control que migran reducen el espacio físico de la herida original (líneas blancas) hasta aproximadamente un 50 % a las 24 horas. Por el contrario, el panel D ilustra que la brecha física de la herida no se modificó después de 24 horas de retirar el inserto cuando las células MCF7 se cultivaron en membranas PAN/G10. Barra de escala: 75µm

Fig. 20 La medición cuantitativa de la anchura de la herida confirmó que no se produjeron cambios significativos (n.s) en este parámetro cuando las células MCF7 se cultivaron en membranas PAN/G10 (0h vs 24h). Datos de 3 experimentos independientes. Las barras representan la media $\pm$ DE. ***: $p < 0,0005$.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Membranas planas (PAN/G) de polímero poliacrilonitrilo (PAN) y grafeno

Preparación de membranas planas (PAN/G) de polímero poliacrilonitrilo (PAN) y grafeno

Las membranas planas de PAN/G se prepararon por inversión de fase. Se prepararon diferentes lotes de solución polimérica con un 2 % en peso, 10 % en peso y 15 % en peso de grafeno (PAN/G2, PAN/G10 y PAN/G15), respectivamente. Así mismo se preparó una solución polimérica PAN que no contenía grafeno.

Para ello, se dispersaron nanoplaquetas comerciales de grafeno (G) multicapa (Av-PLAT-7, Avanzare, La Rioja, España) en el disolvente N-metilpirrolidona (NMP, 99% extrapura, Acros Organics, Madrid, España) por sonicación durante 20 minutos.

Después, se añadió el polímero poliacrilonitrilo PAN (Mw, 150 kDa, J&K Scientific GmbH, Madrid, España) en la dispersión G/NMP y se agitó utilizando un agitador mecánico durante 24 h hasta conseguir una solución PAN/G uniforme.

La solución de polímeros PAN y PAN/G se dejó desgasificar durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de polímero PAN y PAN/G se fundió en una placa de

vidrio con una cuchilla de fundición con una hendidura de 0,2 mm. Inmediatamente se sumergió en un baño de coagulación de agua/NMP (80/20% v/v) hasta la precipitación completa del polímero. La eliminación de las trazas de disolvente se llevó a cabo mediante un procedimiento de lavado, las membranas planas de PAN y PAN/G obtenidas se almacenaron en agua ultrapura hasta las caracterizaciones celulares posteriores. Se estima que al eliminar el 80 % del disolvente, el precipitado está formado únicamente por polímero y grafeno en un porcentaje en peso 50% polímero / 50% grafeno.

Para la caracterización de las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y eléctricas, las muestras de membrana se sumergieron en un baño de glicerol/agua (50/50%v) antes de secarlas para preservar la microestructura de la membrana y luego se dejaron secar al aire.

Caracterización de las membranas planas de PAN y PAN/G

1. Microscopía electrónica de barrido

La estructura y la morfología de la superficie y la sección transversal de las membranas planas de PAN y PAN/G se determinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, EVO MA 15, Carl Zeiss) a una tensión de 20 kV. Las muestras de la sección transversal se congelaron en nitrógeno líquido para su fractura. Todas las muestras se mantuvieron durante la noche a 30 °C bajo vacío y se les aplicó una capa de oro antes de examinarlas.

La fracción de poros en la superficie de las membranas se cuantificó analizando al menos tres imágenes SEM ($n \geq 3$) de la superficie y de la sección transversal utilizando el software ImageJ (Fiji, U. S. National Institutes of Health, USA) siguiendo el procedimiento explicado por Buckman et al. [J. Buckman, S.A. Bankole, S. Zihms, H. Lewis, G. Couples, P.W.M. Corbett, Quantifying porosity through automated image collection and batch image processing: Case study of three carbonates and an aragonite cemented sandstone, Geosci. 7 (2017)].

Además, se midió el grosor de las membranas PAN y PAN/G humedecidas, δ , utilizando un micrómetro electrónico (Standard, Series 293, Mitutoyo) para $n \geq 4$ muestras.

La Figura 1 presenta las imágenes de la superficie (Fig. 1 A-B) y de la sección transversal (Fig. 1 C) de las membranas PAN y PAN/G2, PAN/G10 y PAN/G15 según se indica.

Las membranas PAN y PAN/G2 presentan la típica morfología con superficie densa y no porosa (Fig. 1 A-B, de cada caso) y estructura de poros en forma de dedos en la sección transversal (Fig. 1 C, de cada caso) característica de una rápida inversión de fase entre el disolvente y el coagulante durante la síntesis de las membranas. Las grietas y la fracción de porosidad en la superficie fueron máximas en las membranas PAN/G2

En las membranas PAN/G10 y PAN/G15 se observó como la incorporación progresiva de grafeno en concentraciones más altas (10 % en peso y 15 % en peso), alteró la termodinámica y cinética de inversión de fase del sistema ternario y actuó como punto de ruptura durante el proceso de coagulación del polímero, distorsionando entonces la estructura limpia en forma de dedo (y produciendo una superficie rugosa y agrietada. La fracción de poros en la sección transversal es significativa en las membranas PAN/G15 si se compara con el resto de las membranas.

Tabla 1. Espesor y fracción de poros en la superficie y en la sección transversal de las membranas PAN y PAN/G. Significación estadística respecto a PAN (* $p < 0,05$)

Membrana	Espesor (μm)	Fracción de poros en la superficie (%)	Fracción de poros en la sección transversal (%)
PAN	249 $\pm$ 21	0,2 $\pm$ 0,1	15,1 $\pm$ 3,3
PAN/G2	187 $\pm$ 9	1,8 $\pm$ 0,9	24,9 $\pm$ 11,5
PAN/G10	203 $\pm$ 5	1,7 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 2,5
PAN/G15	196 $\pm$ 15	0,1 $\pm$ 0,1	47,9 $\pm$ 10,7 *

2. Espectroscopia Raman

Las membranas PAN/G10 se determinaron por espectroscopia Raman con un dispositivo Confocal-Raman NRS-4500 JASCO. Se enfocó un haz de longitud de onda de 532 nm de láser de diodo verde con un objetivo 50x MPlan FLN, 0,8 NA para la detección, y se empleó una potencia efectiva del láser de 4,4 mW para todas las mediciones. Todos los análisis se realizaron de 1000 cm^{-1} a 4400 cm^{-1} a una potencia del 25 % con un tiempo de exposición de

10 s y 5 acumulaciones. Se realizó un entramado de 144x88 μm en la membrana PAN/10G con un espacio de 8 μm entre cada punto.

El análisis de los picos y las proporciones se analizó mediante funciones lorentzianas con el software Origin Pro 2017 (OriginLab Corporation) y Micro Imaging Analysis (Spectra Manager
Jasco).

La Figura 2 muestra los espectros Raman característicos de las membranas PAN, las nanoplaquetas de grafeno comerciales y las membranas PAN/G10.

El espectro de las nanoplaquetas comerciales de grafeno presentaba cuatro picos relevantes: la banda D a 1322 cm^{-1} asociada a la presencia de átomos de carbono con hibridación sp^3 o a desórdenes estructurales en la red de carbono, la banda G a 1583 cm^{-1} atribuida a la dispersión de primer orden del fonón E_{2g} de los átomos de carbono sp^2 , la banda D' a 1615 cm^{-1} superpuesta a la banda G y relacionada con defectos de borde y, finalmente, la banda 2D a 2635 cm^{-1} asociada al carácter multicapa del grafeno. Por último, la relación I_{2D}/I_G de 0,4 confirmó que las nanoplaquetas comerciales de grafeno tenían entre 6 y 7 capas, tal como indicaba el proveedor (Avanzare).

El espectro del PAN presenta la banda típica de los grupos nitrilos (-CN) a 2245 cm^{-1} .

El espectro Raman de las membranas PAN/G10 combina los picos característicos del PAN y de las nanoplaquetas de grafeno. En las membranas PAN/G10, las bandas D, G y 2D se desplazaron hacia arriba a 1353 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} y 2707 cm^{-1} respectivamente, respecto a las longitudes de onda del espectro de las nanoplaquetas comerciales de grafeno, lo que está relacionado con la compresión que las nanoplaquetas de grafeno causan sobre las moléculas de polímero.

Para evaluar la eficacia de la dispersión de las nanoplaquetas de grafeno en las membranas PAN/G, se caracterizó la superficie de 0,144x0,088 mm de una membrana PAN/G10 mediante espectroscopia Raman. La intensidad de la banda G, la intensidad relativa de los picos D y G (I_D/I_G), la relación I_{2D}/I_G y la relación I_G/I_{CN} en la superficie de la membrana PAN/G10 se representaron en las Figuras 3 A-D.

Las bandas G y D se detectaron en cualquier punto de la superficie analizada y los valores

homogéneos de la relación I_{2D}/I_G , de una media de 0,32, frente al valor de 0,4 del grafeno comercial, indicaron que el grafeno estaba presente en toda la superficie de la membrana, y que durante la sonicación se produjo una sutil deslaminación de las nanoplaquetas de grafeno originales.

5 Además, en las nanoplaquetas comerciales de grafeno se encontró un valor de la relación I_D/I_G de 0,25, y en las membranas PAN/G10 esta relación también estaba en el rango de 0,15 a 0,43, lo que indica que la química estructural de las nanoplaquetas comerciales de grafeno no se alteró durante el procesamiento con la membrana PAN/G10.

10 Las variaciones de un orden de magnitud en las relaciones I_{CN}/I_G en el rango 0,02-0,2 apuntan a importantes diferencias en la concentración de las nanoplaquetas de grafeno en la superficie de PAN. Las nanoplaquetas de grafeno forman agrupaciones aleatorias en la superficie de PAN en las membranas PAN/G preparadas.

15 *3. Ángulo de contacto con el agua*

Se midió el ángulo de contacto con el agua en membranas PAN y PAN/G secas para determinar la humectabilidad. Se depositó cuidadosamente una gota de agua ultrapura con una jeringa sobre la superficie de la membrana y se tomaron imágenes inmediatamente. El ángulo de contacto con el agua se midió utilizando el software Meazure (C Thing Software) con no menos de nueve imágenes ($n \geq 9$).

La figura 4 muestra el ángulo de contacto con el agua de las membranas PAN/G.

25 Los valores del ángulo de contacto con el agua son inferiores a 65° en todos los sustratos, lo que indica la naturaleza hidrofílica general de las membranas.

La hidrofobicidad del grafeno aumenta ligeramente el ángulo de contacto con el agua desde $62^\circ \pm 3^\circ$ para PAN hasta $69^\circ \pm 3^\circ$ para PAN/G2 y $66^\circ \pm 1^\circ$ para las membranas PAN/G10.

30 *4. Impedancia eléctrica*

Las propiedades de conductividad eléctrica y permitividad dieléctrica se evaluaron a lo largo del espesor de las membranas PAN/G2, PAN/G10 y PAN/G15 mediante mediciones de

impedancia eléctrica en muestras de membranas secas. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un medidor RCL automático programable PM 6304 (Philips) que estaba conectado a dos láminas de níquel que actuaban como electrodos con una superficie de contacto (S) de 5×5 cm². Las membranas secas, utilizadas como electrolitos, se cortaron y se situaron entre las láminas cubriendo su área de contacto. El sistema se fijó con abrazaderas durante las mediciones y los ensayos se realizaron para al menos dos muestras de cada membrana plana ($n \geq 2$) utilizando una variación de la frecuencia potencial (f) en el rango de 50 a 100.000 Hz a temperatura ambiente. El equipo da como resultado el módulo de impedancia (Z) y el ángulo de fase (ϕ).

La resistividad de las membranas (ρ , $\Omega \cdot m$) se calculó mediante la ecuación 1:

$$\rho = Z \cdot \cos \phi \cdot S / \delta \quad (1)$$

Donde S es la superficie del área de contacto (m²) y δ es el espesor de las membranas (m).

Mientras que la permitividad dieléctrica (ϵ_r) se obtiene como sigue:

$$\epsilon_r = \delta / 2\pi f Z \cdot \sin \phi \cdot S \quad (2)$$

Finalmente, la conductividad eléctrica (σ , S·m⁻¹) y la permitividad dieléctrica relativa (ϵ') se calcularon como se expresa en las ecuaciones 3 y 4, respectivamente, donde ϵ_0 es la constante de permitividad del vacío, 8,85 10⁻¹² F m⁻¹.

$$\sigma = 1/\rho \quad (3)$$

$$\epsilon' = \epsilon_r / \epsilon_0 \quad (4)$$

Las figuras 3B y 3C muestran la permitividad dieléctrica relativa y la conductividad eléctrica de las diferentes membranas PAN/G a diferentes concentraciones de grafeno (2 %, 10 % y 15 %).

Los resultados obtenidos para las membranas PAN/G muestran que para todas las concentraciones de grafeno estudiadas (2 %, 10 % y 15 %), la conductividad aumenta exponencialmente con la frecuencia, lo que se atribuye a un efecto de salto de electrones asistido por la frecuencia que se produce cuando ésta aumenta.

Por otro lado, la permitividad dieléctrica de las membranas PAN/G a todas las concentraciones de grafeno estudiadas (2 %, 10 % y 15 %) disminuye con la frecuencia. A bajas frecuencias, la permitividad dieléctrica alcanza valores extraordinariamente altos del orden de 10^6 .

5 Las membranas PAN/G10 presentan la máxima conductividad eléctrica y permitividad dieléctrica (propiedades eléctricas óptimas), mientras que las membranas PAN/G15 sorprendentemente presentan menor conductividad (por debajo de 10^4 Hz) y menor permitividad dieléctrica (en todo el rango de frecuencias estudiado) que las membranas PAN/G2. Esta reducción de las propiedades eléctricas podría explicarse por la formación de
10 grandes agregados de grafeno que dificultaban las redes de transporte de carga o por la formación de mayor cantidad de huecos o poros como se observa en la sección transversal de las membranas de PAN/G15 en contraste con el resto de las membranas (ver Figuras 5 A y B).

15 ***Estudio de biocompatibilidad de las membranas PAN/G con células cancerosas***

1. Cultivos celulares. Ensayos y métodos de análisis

El estudio *in vitro* de la biocompatibilidad del PAN y de las membranas (PAN/G) se llevó a
20 cabo principalmente en la línea celular de cáncer de mama humano MCF7 (HTB-22, ATCC). También se estudió su efecto sobre el fenotipo de células de neuroblastoma murino NSC34 (CLU140, Cedarlane Laboratories), neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266, ATCC), glioma humano U87 (HTB-14, ATCC), cáncer cérvix humano HeLa (CCL-2 from ATCC), glioma de rata C6 (CCL-107TM, ATCC). Como líneas celulares de origen no cancerígeno se
25 utilizaron las células mesenquimales humanas ASC52telo (SCRC-4000, ATCC) y fibroblastos embrionarios de ratón control (MEF).

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con alto contenido en glucosa y sin piruvato sódico (Gibco), enriquecido con un 10
30 % de suero fetal bovino (FBS), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. En condiciones normales, las células se pasaron cuando alcanzaron el 80 % de confluencia y el medio se cambió cada 2 días.

35 Para preparar las membranas PAN y PAN/G para el cultivo celular, se cortaron muestras

circulares de Ø12 mm a partir de secciones representativas y homogéneas de las membranas PAN y PAN/G ya preparadas. Utilizando silicona quirúrgica, se pegaron a un cubreobjetos de vidrio de Ø10 mm (TCP) para evitar que flotaran. Cada muestra se esterilizó con etanol EtOH al 70% v/v en agua destilada durante 30 minutos y posteriormente se expuso a la luz UV durante 15 minutos bajo una cabina laminar vertical de bioseguridad tipo II. Por último, las membranas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril para eliminar los restos de etanol.

Para sembrar las células en las membranas PAN y PAN/G, se sembraron 3×10^5 células por cm^2 de manera uniforme en las membranas planas, excepto en el caso de NSC34 que se sembraron 5×10^5 células por cm^2 . Las placas de cultivo celular se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 y se dejaron fijar durante 24 horas.

- *Ensayo TUNEL para la apoptosis*

La tinción TUNEL se realizó en células MCF7 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio o en membranas PAN/G10 utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ* conjugado con FITC (Roche) según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, las células fijadas en paraformaldehído (PFA) al 3,7% en tampón fosfato salino (PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente se incubaron en el reactivo (dilución 1:10 de la solución enzimática (desoxinucleotidil transferasa terminal de tipo de ternera) en solución de etiqueta (mezcla de nucleótidos)) en una cámara húmeda durante 45 minutos a 37 °C. Las muestras se contrastaron con el marcador nuclear fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se montaron utilizando el medio antifade Vectashield (VectorLabs).

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 Plus, ZEISS) con un aumento de 20X acoplado a una cámara (Axiocam HRC). Se cuantificaron las células positivas a TUNEL a partir de un mínimo de cinco imágenes, con al menos 50 células por imagen, y se cuantificó el porcentaje medio de células apoptóticas.

- *Espectroscopia Raman*

Se tomaron diferentes puntos discretos a dos alturas distintas ($Z=0$ y $Z=15$) para el análisis

de los cúmulos de células cancerosas MCF7 en la membrana de superficie PAN/G10 por espectroscopia Raman. En este caso, para evitar daños en las muestras biológicas, se utilizó una potencia láser incidente baja (1,8 mW al 10 %) con un tiempo de exposición de 5 s y 5 acumulaciones. Estos análisis se realizaron en el rango de 600 a 3800 cm⁻¹.

5 De nuevo, el análisis de los picos y las proporciones se analizó mediante funciones lorentzianas con el software Origin Pro 2017 (OriginLab Corporation) y Micro Imaging Analysis (Spectra Manager Jasco).

10 • *Inmunofluorescencia y microscopía confocal*

Las muestras celulares se fijaron con PFA al 3,7 % en PBS durante 15 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,5 % en PBS) durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

15 A continuación, las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-E-cadherina (1:100, BD Transduction Laboratories) para marcar las uniones celulares estrechas.

20 Al día siguiente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron durante 45 min en el anticuerpo secundario específico conjugado con Cy3 (1:750, Jackson ImmunoResearch Laboratories).

25 Algunas muestras seleccionadas se contrastaron con Phalloidin conjugada con el fluorocromo FITC (Sigma), que se une a la F-actina polimerizada, utilizado para identificar los filamentos de actina del citoesqueleto, y con 1µg-ml⁻¹ de DAPI (4', 6-diamidino-2- fenilindol) para marcar el ADN y reconocer los núcleos celulares.

30 Todas las muestras se montaron con el medio antifading Vectashield (VectorLabs) y se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio confocal láser LSM510 (Zeiss) utilizando un objetivo de aceite de 63× (1,4 NA). Para evitar la superposición de señales, las imágenes se obtuvieron mediante excitación secuencial a 488 nm y 543 nm, para detectar FITC y Cy3, respectivamente. A continuación, las imágenes se procesaron con el software Photoshop CC2019.

- *Microscopía electrónica de transmisión*

Para el examen de las uniones celulares, las muestras de membranas planas PAN/G10 con células MCF7 cultivadas durante 48 horas se fijaron utilizando glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,12 M (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 0,12 M) a pH 7,4 durante 2 h, se lavaron en tampón fosfato 0,12 M tres veces y se fijó de nuevo en OsO_4 al 1 % durante 3 h, se lavó de nuevo y se deshidrató en concentraciones crecientes de acetonas seguido de su inclusión en Araldite (Electron Microscopy Sciences).

Se obtuvieron secciones transversales (500 μm de grosor) con un vibratomo (Microm HM 650V, Thermo Scientific) teniendo en cuenta la presencia de la membrana plana PAN/G10. Las secciones ultrafinas montadas en rejillas de cobre se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM 1011 operado a 80 kV.

- *Ensayo Western blotting*

Las células MCF7 se rasparon de las membranas planas PAN/G10 ($n = 3$) y del vidrio de control ($n = 3$) y se resuspendieron en tampón Laemmli 1X (2 % SDS, 0,1 % 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol, 0,0005 % azul de bromofenol y 63 mM Tris-HCl pH 6,8) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras se hirvieron durante 10 minutos a 98 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C recogiendo el sobrenadante.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE Nu-Page TG al 4-20% (Invitrogen), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,2 μm de tamaño de poro, Life Technologies) siguiendo procedimientos estándar.

A continuación, las membranas se enjuagaron dos veces con PBS con 0,1 % de Tween-20 (PBS-T) y se bloquearon con un 5 % de BSA (Biorad) en PBS-T.

Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios; anticuerpos policlonales de conejo anti-E-Cadherina (Cell Signaling Technology, dilución 1:1000) y anti-Histona H3 (Pierce, dilución 1:5000) diluidos en BSA al 0,5 % en PBS-T durante una noche a

4 °C.

Después, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios específicos anti-conejo IRDye680DX (Rockland Immunochemicals, USA) diluidos 1:5000 en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las bandas de proteínas se detectaron con un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey™ (Li-Cor Biosciences) según el protocolo Odyssey™ Western-Blotting. Para el análisis cuantitativo de los blots se utilizó el software ImageJ.

- *PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para el análisis de la expresión génica relativa*

Las células MCF7 se cultivaron en los sustratos desarrollados de PAN/G10) o en placas de cultivo (Control) durante 48 horas (n = 3), y se utilizaron para los estudios de RT-qPCR. El ARN se extrajo de los cultivos celulares utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad) y se purificó con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Un microgramo de ARN se transcribió de forma inversa a ADN codificante (cADN) utilizando un kit de transcripción inversa de cADN de alta capacidad (Life Technologies) con oligos Hexamer hexámeros aleatorios como cebadores. La expresión de los mARNs específicos de los genes *ID1* y *CDH1* se determinó mediante RT-qPCR utilizando oligos cebadores específicos (*ID1* forward 5'-AATCCGAAGTTGGAACCCCC-3' (SEQ ID NO: 1) e *ID1* reverse 5'-ACACAAGATGCGAT CGTCCG-3' (SEQ ID NO: 2); *CDH1* forward 5'-GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG-3' (SEQ ID NO: 3) y *CDH1* reverse 5'-TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG-3' (SEQ ID NO: 4). Cada ensayo individual de qRT-PCR se realizó por triplicado técnico. Se determinó el ciclo umbral (Ct) para cada pocillo y los resultados se normalizaron con respecto a la expresión del gen GAPDH *GAPDH* forward 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG -3' (SEQ ID NO: 5), *GAPDH* reverse 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3' (SEQ ID NO: 6). La expresión génica relativa se calculó según la ecuación $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

- *Cuantificación, medidas morfométricas y análisis estadístico*

Los experimentos celulares cuantitativos se realizaron por triplicado para cada línea celular y sustrato. La capacidad de adhesión (d_0) de las células para adherirse a las membranas planas PAN y PAN/G se evaluó en células teñidas con DAPI utilizando un microscopio de luz de epifluorescencia (AxiosKop 2 plus, Zeiss) acoplado a una cámara AxioCam HRc (Zeiss). Se

5 contó el número total de células con núcleo por unidad de superficie a partir de al menos 3 micrografías de adhesión con un mínimo de 50 células por imagen.

Además, se realizó un análisis morfológico de las líneas células celulares (MCF7 y NSC34) teñidas con Phalloidin-FITC para comparar la morfología celular 24 h después de la siembra

10 en las membranas planas de vidrio o PAN/G10 de control.

Utilizando el software ImageJ, se obtuvo el valor del área celular y el factor de forma de circularidad de células MCF7 y NSC34. El factor de forma de circularidad se define como el grado en que la partícula es como un círculo, teniendo en cuenta la suavidad del perímetro ($C = \sqrt{(4 \cdot \pi \cdot A / P^2)}$). Este factor varía entre 0 y 1 dependiendo de si la forma de la célula es

15 redonda (valor cercano a 1) o fusiforme (valor cercano a 0).

Todos los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar (DE) y los datos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student de dos colas no apareadas para determinar las

20 diferencias entre los dos grupos. La significancia estadística se consideró como $p < 0,05$.

- *Ensayo de cierre de heridas ("wound-healing assay")*

El ensayo de cierre de heridas *in vitro* se llevó a cabo utilizando placas IBIDI μ (35 mm, IBIDI GmbH). Los moldes adheridos en el fondo de la placa de cultivo IBIDI permiten que las células crezcan en dos áreas designadas (cada una de 0,22 cm²) creando un área libre de células de tamaño predeterminado de $500 \pm 100 \mu\text{m}$. Para cultivar las células sobre los dos sustratos diferentes, las membranas PAN/G10 y los cubreobjetos de vidrio como control, primero se retiraron los moldes de separación de las placas IBIDI, y se colocaron los sustratos de

25 crecimiento (PAN/G10 y vidrio) en el fondo de las placas IBIDI sobre las que se pegaron nuevamente los moldes utilizando silicona quirúrgica biocompatible.

30

Se sembraron células MCF7 (6×10^5 células por placa) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂ durante 24 horas o hasta que se confirmó, mediante un

microscopio DIC invertido, que las células en el sustrato control eran confluentes. En este momento, una de las placas IBIDI (punto 0 h) con cada sustrato se fijó con PFA al 3,7 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se retiraron los moldes con pinzas estériles de la segunda placa IBIDI dejando descubierta la “herida”. Después de 24 horas, se fijó esta placa para el análisis del avance celular sobre la “herida” (punto 24 h).

La migración de las células teñidas con Phalloidin-FITC sobre la herida libre de células se observó mediante la captura de imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 Plus, ZEISS) con un aumento de $\times 10$ acoplado a una cámara (Axiocam HRC). Las imágenes digitalizadas se analizaron utilizando el software ImageJ, estableciendo la escala correcta para medir el cierre de la anchura de la herida (μm), en los diferentes puntos temporales. Se analizaron cinco imágenes de cada herida sobre las que se realizaron 20 mediciones.

2. Resultados

- Para investigar los efectos del grafeno en PAN en la morfología y el comportamiento de las líneas celulares cancerosas se cultivaron las células sobre cubreobjetos de vidrio (Control) y sobre membranas PAN y PAN/G10.

Se observa que la presencia de un 10 % de grafeno es necesaria para la adhesión de NSC34 a las membranas PAN/G y se establece que las membranas PAN/G10 proporcionaban unas propiedades de adhesión óptimas con una citotoxicidad mínima (Fig. 6 A-J). Por lo tanto, y debido a que presentan unas propiedades eléctricas óptimas, seleccionamos PAN/G10 para continuar con el estudio experimental.

- Para determinar los posibles cambios en el tamaño y la forma de las células cancerosas inducidos por PAN/G10, teñimos las células cancerosas cultivadas con Faloidina- FITC, marcador citoquímico de los microfilamentos de actina polimerizados.

Mientras que las células cancerosas MCF7 y NSC34 cultivadas sobre la superficie control (Ctrl) mostraban una forma de estrella con varios procesos celulares, las células cancerosas MCF7 y NSC34 perdieron sus expansiones y se volvieron poligonales, con un fenotipo de tipo epitelial formando grupos de células, cuando se cultivaron en PAN/G10 (Fig. 7A-D). La

determinación planimétrica de la superficie celular de ambos tipos celulares mostró una reducción significativa del tamaño celular dependiente de PAN/G10 (Fig. 8). Estas observaciones se confirmaron en otras líneas celulares derivadas de tumores malignos de múltiples tejidos (neuroblastoma SH-SY5Y, cáncer de cérvix HeLa, glioma U87 y glioblastoma C6) y especie de origen (humano, ratón o rata) (Fig. 7E-L). Cabe destacar que el fenotipo (forma y tamaño) de células de origen no-tumoral (ASC52 y MEF) no sufrieron cambios destacables cuando fueron cultivadas durante 24 h sobre PAN/G10 (Fig. 7M-P).

El factor de forma se describe mediante la ecuación

$$\text{Factor de forma} = 4\pi A/P^2$$

donde A es el área de la superficie y P el perímetro. Para un círculo el factor de forma es la unidad, para un segmento de línea su valor es cero.

La estimación del factor de forma reveló un aumento significativo de este factor en las células cancerosas MCF7 y NSC34 cultivadas en PAN/G10 (Ver Figura 8 A y B). Este hallazgo refleja la adquisición de una forma celular poligonal más regular, de tipo epitelial para las células cancerosas cultivadas sobre membranas PAN/G10.

- Para investigar si la presencia de PAN/G10 inducía citotoxicidad se realizó un ensayo TUNEL de apoptosis.

Una proporción mínima de células tumorales MCF7, aproximadamente el 1%, cultivadas en medio de control o en PAN/G10 sufre apoptosis, no siendo significativa la diferencia entre el medio de cultivo de control y PAN/G10 (Fig. 9 A y B).

- Para investigar si las agrupaciones de células cancerosas MCF7 se localizaban preferentemente en las regiones ricas en grafeno o en las regiones ricas en polímeros PAN, se tomaron espectros Raman en dos ubicaciones diferentes (punto A y B) y a dos alturas distintas ($Z=0$ y $15\text{ }\mu\text{m}$) sobre la superficie de la membrana PAN/G10, como se representa esquemáticamente en la Figura 10 A, B y C.

El análisis del espectro del punto A en la ubicación $Z=15\text{ }\mu\text{m}$ de la membrana PAN/G10 reveló que no había células en este punto. Los picos a 910 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} fueron referidos previamente a PBS. Se observan igualmente las señales correspondientes a las bandas D, G

y 2D (1352 cm^{-1} , 1583 cm^{-1} y 2707 cm^{-1} , respectivamente) de la resonancia de la membrana PAN/G10.

5 Por otro lado, el espectro Raman correspondiente al punto B en $Z=15\text{ }\mu\text{m}$ sobre la superficie de la membrana PAN/G10 muestra importantes señales de bandas características de biomoléculas que confirman la presencia de células MCF7. Las bandas a 2906 cm^{-1} y 2962 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones CH_2 de los lípidos y CH_3 de las proteínas. Los picos a 789 cm^{-1} , 1089 cm^{-1} y 1509 cm^{-1} pueden atribuirse a la respiración del anillo de la citosina, al estiramiento simétrico del PO_2 en los ácidos nucleicos y a la vibración de la banda del anillo de imidazol en relación con las bases de los ácidos nucleicos, respectivamente. Además, también estaban presentes otras características espectrales relacionadas con las proteínas, como el modo de respiración del anillo de fenilalanina (1003 cm^{-1}) y la característica espectral de la amida III (entre 1250 cm^{-1} y 1325 cm^{-1}).

15 La aparición de las bandas D y G características del grafeno en las membranas PAN/G10 podría superponerse a otras bandas importantes características de las biomoléculas dificultando su identificación. Curiosamente, la relación $I_{\text{CN}}/I_{\text{G}}$ calculada a partir de los espectros de los puntos A y B en $Z=0\text{ }\mu\text{m}$ fue de 0,22 y 0,05, respectivamente. Esto indica que las agrupaciones de células se localizan preferentemente en puntos de la superficie de la membrana PAN/G10 ricos en grafeno.

- Ejemplo comparativo:

25 Se prepararon membranas PAN/G10 con una distribución homogénea del grafeno utilizando condiciones más exigentes de sonicación del grafeno en la disolución polimérica y se caracterizaron mediante espectroscopía Raman la distribución del grafeno dentro de la matriz polimérica de PAN confirmándose una distribución homogénea del grafeno en las nuevas membranas PAN/G10. Véase Figura 11 A.

30 Dichas membranas PAN/G10 con una distribución homogénea del grafeno no presentan la formación de agrupaciones celulares, en las imágenes se observaban la formación de filopodios y lamelipodios, que controlan el movimiento de la célula. Véanse Figuras 11 (B-E).

- Para investigar más a fondo el efecto de PAN/G10 en el comportamiento de asociación

de las células cancerosas MCF7 se utilizó un análisis de microscopía de fluorescencia para F-actina y E-cadherina.

Mientras que las células cancerosas MCF7 de control mostraban su morfología irregular y no establecían la unión de adherencia (Fig. 12 A y E), las células cancerosas MCF7 cultivadas en PAN/G10 se agregaban progresivamente en islotes celulares (Fig. 12 B).

El volumen de estos islotes celulares cancerosas MCF7 aumentó con el tiempo (Fig. 12C) debido a la proliferación celular y, como se observó mediante microscopía confocal de células vivas, al secuestro de las células cercanas que aún mostraban un fenotipo mesenquimal.

Cabe destacar que los islotes de células cancerosas MCF7 son sólidos, como se observó mediante la adquisición de imágenes confocales en serie de todo el volumen de los islotes (Fig. 13).

- Para comprender mejor los cambios fenotípicos inducidos por el uso de membranas PAN/G10, se analizó la expresión del gen *ID1*, que codifica un regulador transcripcional implicado en la diferenciación celular, particularmente en la transición mesenquimal a epitelial.

La determinación por RT-qPCR de los niveles de ARNm de *ID1* reveló un aumento drástico, unas 14 veces, en los islotes celulares de MCF7 formados sobre PAN/G10 en relación con las células de control (Fig. 14). Este resultado sugiere que el crecimiento de la célula cancerosa MCF7 sobre regiones de PAN ricas en grafeno (PAN/G10) induce una transición de un fenotipo mesenquimal a un fenotipo más similar al epitelial, lo que se conoce como transición mesénquima-epitelio (MET).

Además, se observó que los islotes celulares de MCF7 aparecían estrechamente empaquetados por uniones adherentes de tipo banda inmunomarcadas para la E-cadherina que rodeaban completamente las células (Fig. 12F). Las uniones adherentes estaban estrechamente asociadas con filamentos de actina teñidos con faloidina-FITC que también rodeaban las células justo por debajo de la membrana plasmática.

Los perfiles lineales de las señales de intensidad de fluorescencia de actina y E-cadherina a

lo largo de las uniones adherentes confirmaron la colocalización de ambas moléculas (Fig. 15).

El aumento de la expresión de E-cadherina en las células MCF7 cultivadas en PAN/G10 se validó mediante Western Blot de lisados celulares (Fig. 16).

- Considerando que el silenciamiento epigenético del gen *CDH1* (E-cadherina) en los tumores humanos sólidos (incluidas las células de cáncer de mama) está implicado en la regulación a la baja de la E-cadherina. se investigó si las células cancerosas MCF7 cultivadas en PAN/G10 son capaces de rescatar la expresión de *CDH1*.

La determinación por RT-qPCR de los niveles de ARNm de *CDH1* reveló un aumento significativo en las células MCF7 derivadas del cáncer de mama cultivadas en PAN/G10 en relación con las de control (Figura 17). Este hallazgo apoya que la presencia de regiones de PAN ricas en grafeno (PAN/G10) promueve la desrepresión epigenética del gen que codifica la proteína de las uniones adherentes E-cadherina.

El examen por microscopía electrónica mostró células aplanadas con núcleos con un patrón de cromatina laxa (eucromatina) indicativo de alta actividad transcripcional y la presencia de uniones adherentes típicas de las células epiteliales (Fig. 18 A y B). En conjunto, nuestros hallazgos sobre el comportamiento de asociación de las células MCF7 y su mayor expresión de *ID1* y *E-cadherina* cuando se cultivan en PAN/G10 sugieren que la membrana PAN/G10 es capaz de inducir una transición a su fenotipo original epitelial donde la capacidad celular migratoria y metastática está normalmente impedida.

- La migración celular desempeña un papel fundamental en las etapas de invasión y metástasis de las células cancerosas. La actividad migratoria de estas células en el cáncer sólido depende de propiedades intrínsecas de las células tumorales. Entre ellas se encuentran la desregulación del citoesqueleto de actina, la pérdida de la expresión de E-cadherina y la alteración de la expresión de integrinas y metaloproteasas, así como cambios en las interacciones célula-matriz extracelular. Para determinar los efectos del grafeno en el comportamiento migratorio de las células MCF7 utilizamos un ensayo bidimensional de cerrado de heridas en ausencia (Fig. 19 A-B) o en presencia de PAN/G10 (Fig. 19 C-D).

En la Figura 19 se ilustran imágenes de las áreas heridas de los puntos temporales 0 y 24 horas. Las mediciones de la anchura a mostraron que la herida se cerró a la mitad en 24 horas en los cultivos de control, mientras que no se detectó una actividad migratoria significativa en las células MCF7 cultivadas en PAN/G10 (Figura 12E).

En conclusión, las propiedades biofísicas de la membrana PAN/G10 inducen un reordenamiento de las células cancerosas de MCF7 hacia una transición de tipo epitelial con aumento de la adhesión intercelular e inhibición de la actividad migratoria en la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano.

REIVINDICACIONES

1. Material compuesto en forma de membrana plana caracterizado por que consiste en

- un polímero biocompatible de poliacrilonitrilo en forma de membrana plana de espesor de entre 198 μm y 208 μm , y

5

- una pluralidad de nanoplaquetas de grafeno,
 - donde las nanoplaquetas de grafeno están en un porcentaje en peso de entre un 33 % y un 60 % en el material compuesto,
 - donde las nanoplaquetas de grafeno se localizan en la superficie de polímero biocompatible de poliacrilonitrilo formando agrupaciones de nanoplaquetas de grafeno de forma aleatoria,

10

donde la fracción de poros en la superficie del material compuesto oscila entre 1,1 % y 2,3 %, y donde la fracción de poros en la sección transversal del material compuesto oscila entre 15,2 % y 20,2 %.

15

2. El material compuesto según la reivindicación 1, en el que el ángulo de contacto con el agua oscila entre 65° y 67°.

3. El material compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde las nanoplaquetas de grafeno están en un 50 % en peso en el material compuesto.

20

4. Procedimiento de obtención del material compuesto en forma de membrana plana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, por que comprende las siguientes etapas:

a) dispersar nanoplaquetas de grafeno en un disolvente seleccionado de entre N-metilpirrolidona, dimetilacetamida y una combinación de los mismos, por sonicación,

25

b) añadir poliacrilonitrilo sobre la dispersión de nanoplaquetas de grafeno obtenida en la etapa (a) y agitar para obtener una solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno homogénea, donde el porcentaje en peso de las nanoplaquetas de grafeno en la solución es de entre 5 % y 15 %,

30

c) desgasificar la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno durante un periodo de tiempo de entre 8 h y 24 h a temperatura ambiente,

d) extender la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno obtenida en la etapa (c) sobre una placa de vidrio

e) sumergir la solución de poliacrilonitrilo-nanoplaquetas de grafeno desgasificada

obtenida en la etapa (d) en un primer baño de coagulación que comprende

- agua y/o
- un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona, Dimetilacetamida y una combinación de los mismos,

5 y f) eliminar los restos de disolvente del producto obtenido en la etapa (e) en un segundo baño de agua.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, el porcentaje en peso de las nanoplaquetas de grafeno en la solución de la etapa (b) es del 10 %.

10

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde el primer baño de coagulación de la etapa (e) comprende

- agua y
- un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona, Dimetilacetamida y una combinación de los mismos.

15

7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde el porcentaje en volumen del primer baño de coagulación es de 80 % de agua y 20 % de un disolvente seleccionado de entre N-metil pirrolidona, Dimetilacetamida y una combinación de los mismos.

20

8. Uso del material compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como sustrato o andamiaje para el cultivo *in vitro* de células cancerosas.

9. Uso según la reivindicación 8 como sustrato o andamiaje para el cultivo *in vitro* de células cancerosas, donde esas células cancerosas proceden de un cáncer sólido extraído de un sujeto que padece cáncer.

25

10. Uso como sustrato o andamiaje para el cultivo *in vitro* de células cancerosas según la reivindicación 9, donde el cáncer sólido es cáncer de mama.

30

Fig. 1

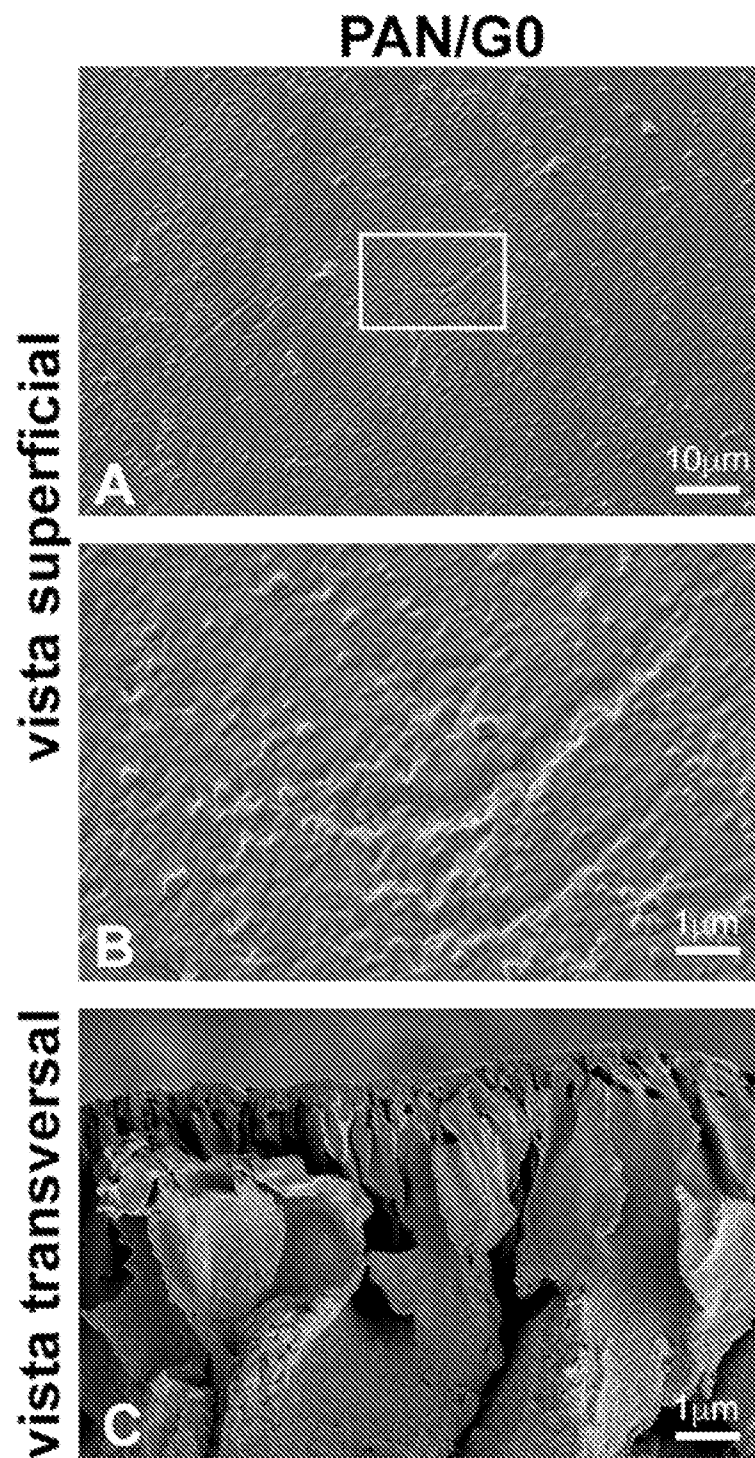


Fig. 1. Cont.

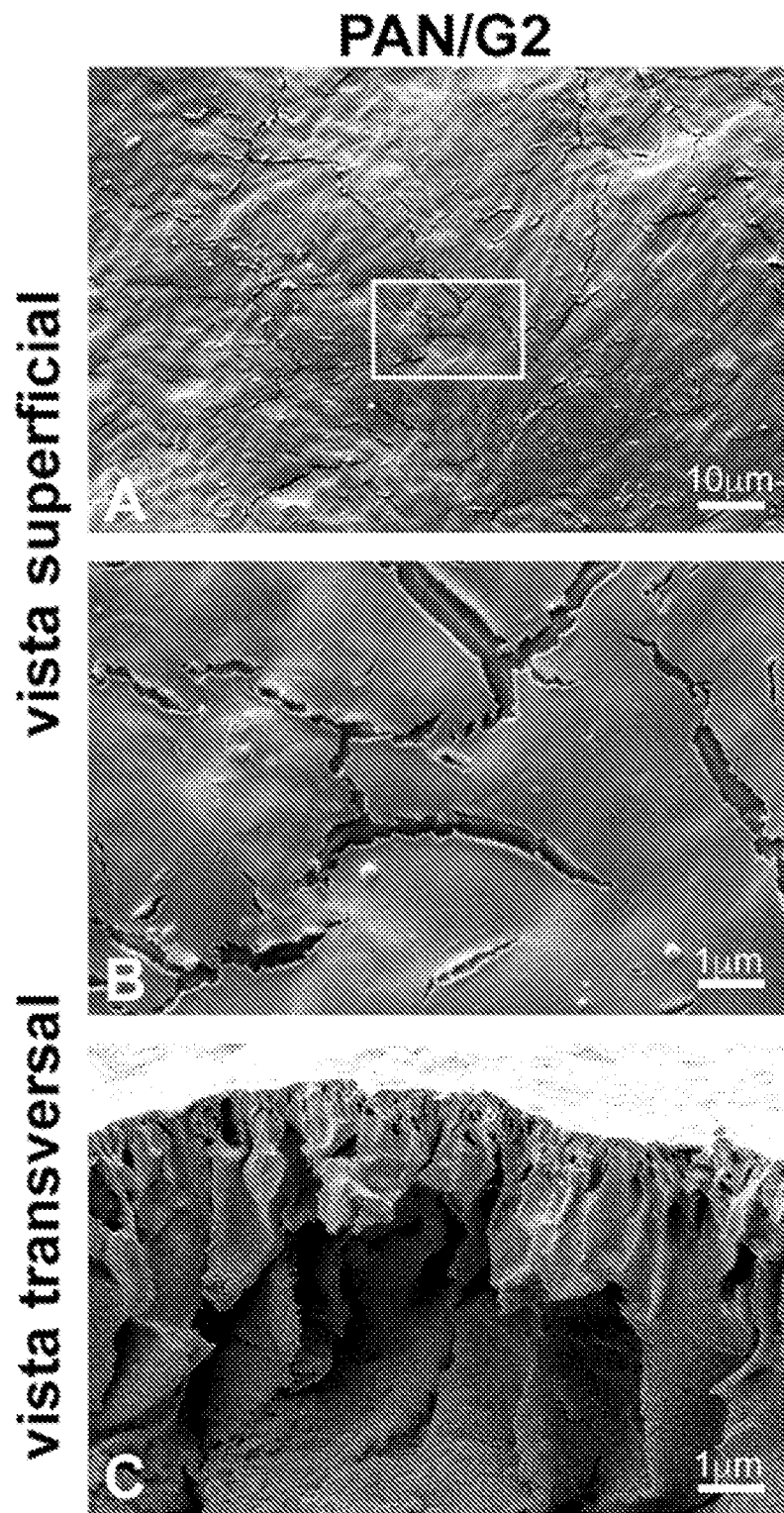


Fig. 1. Cont.

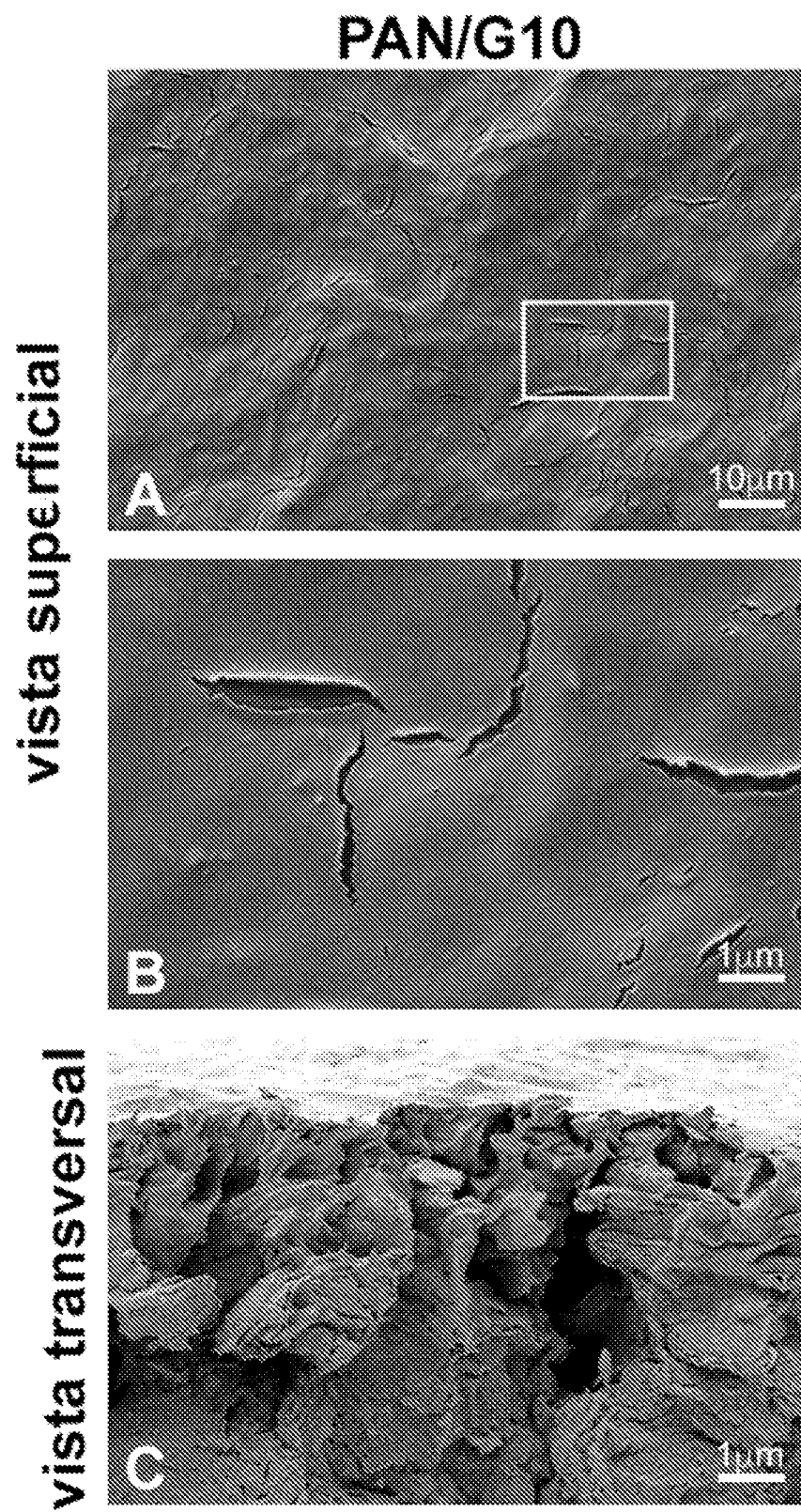


Fig. 1 Cont.

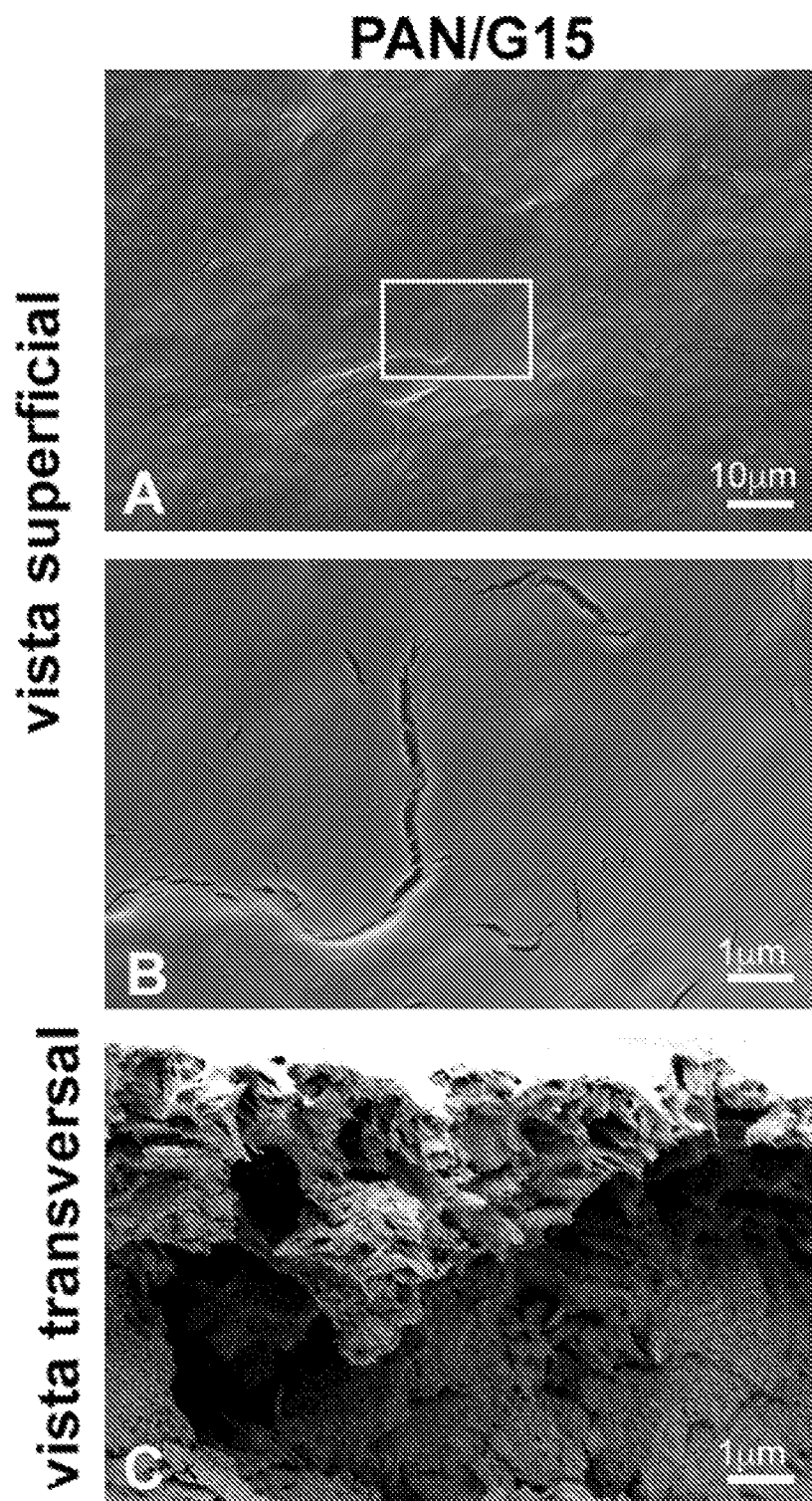


Fig. 2

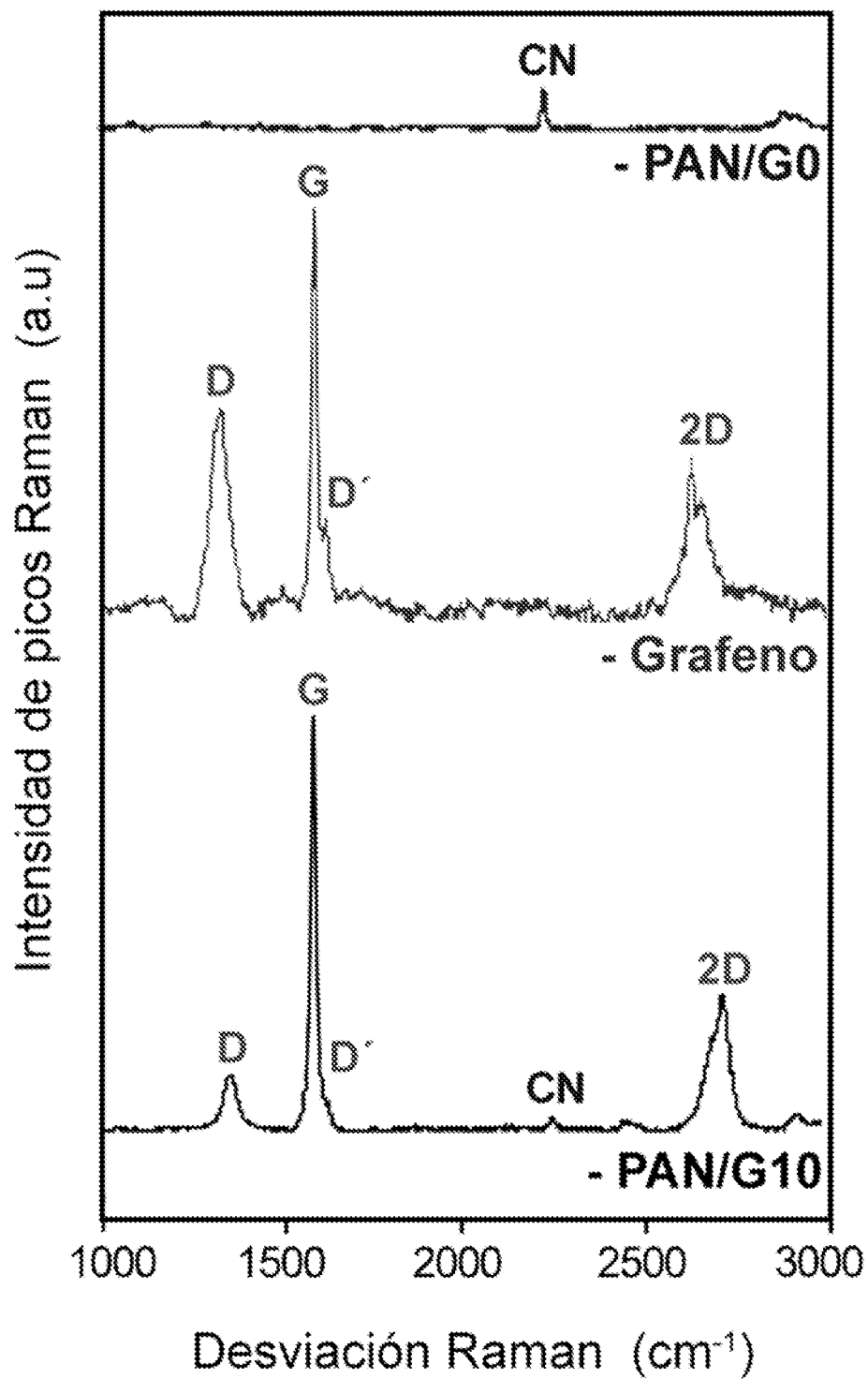


Fig. 3

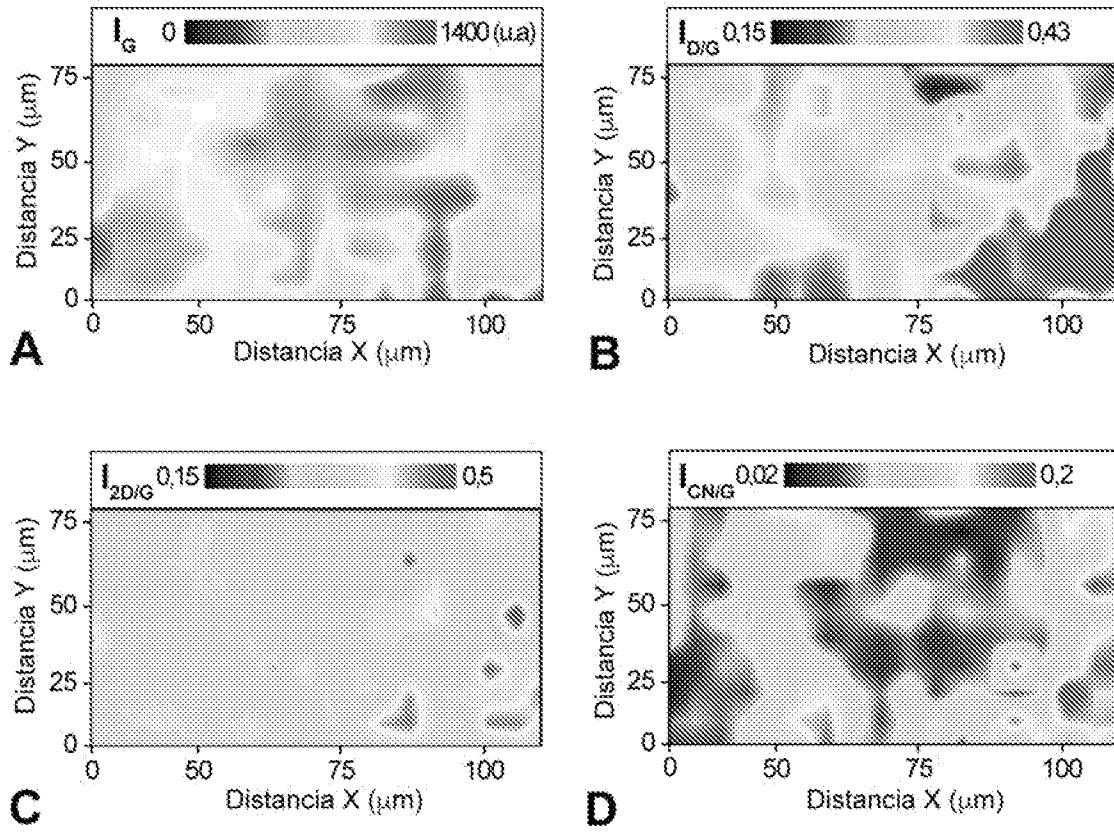


Fig. 4

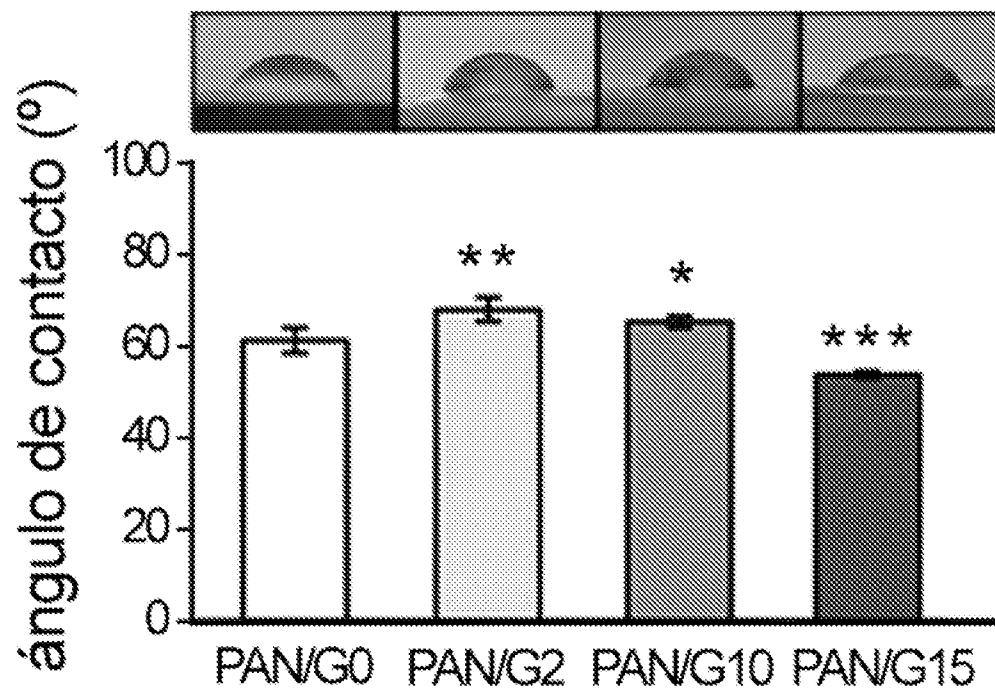


Fig. 5

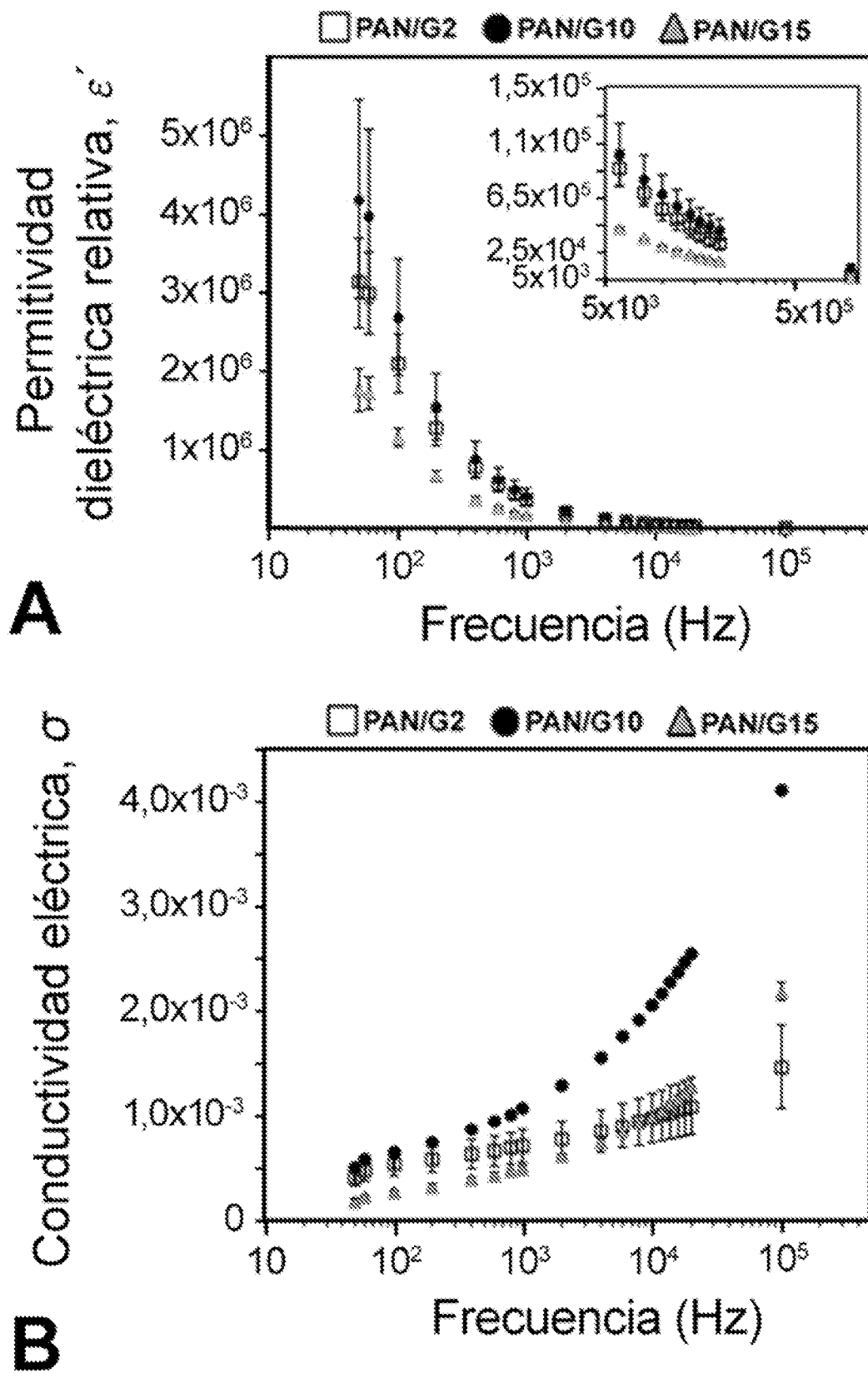


Fig. 6

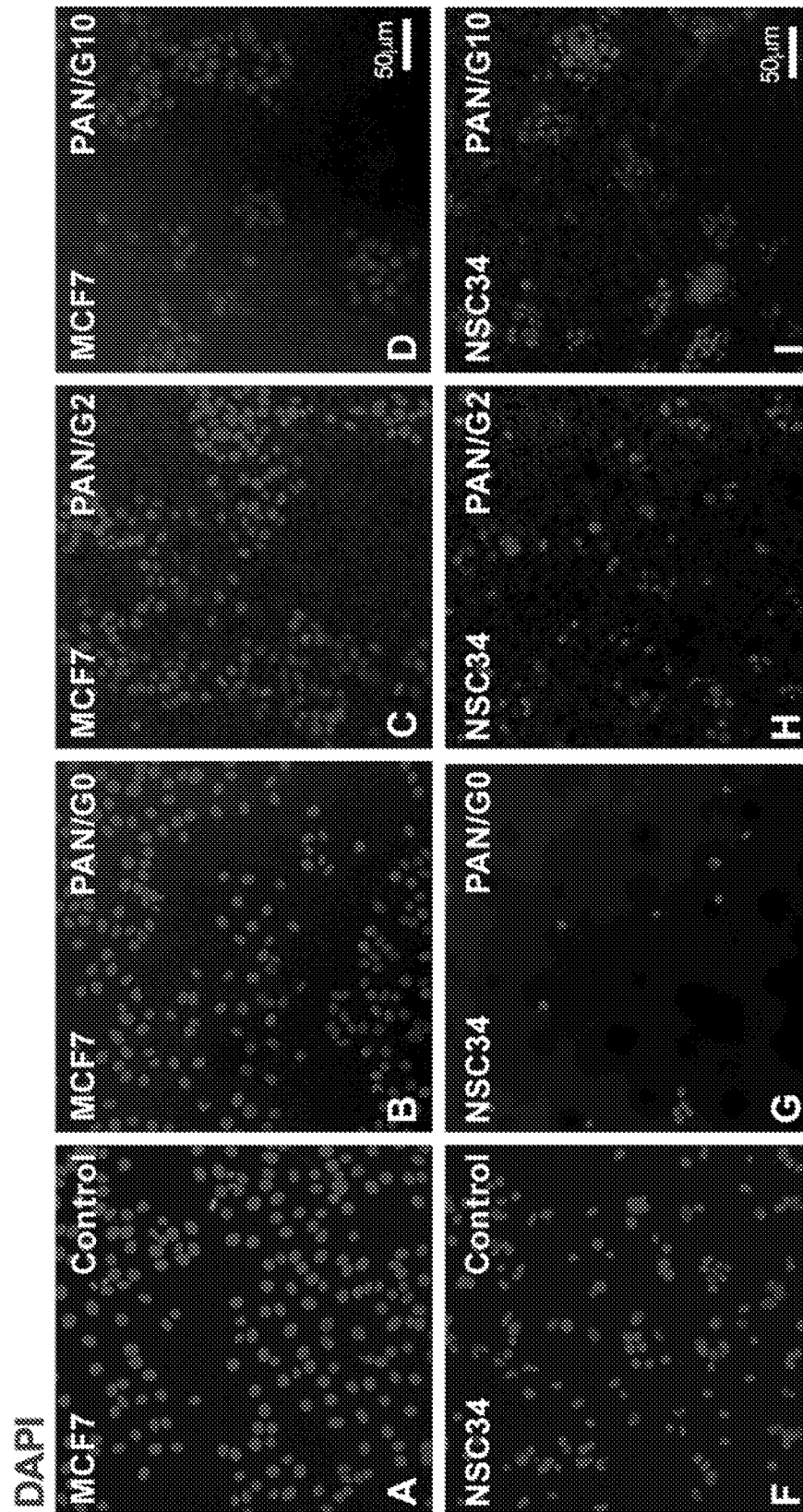


Fig. 6 Cont.

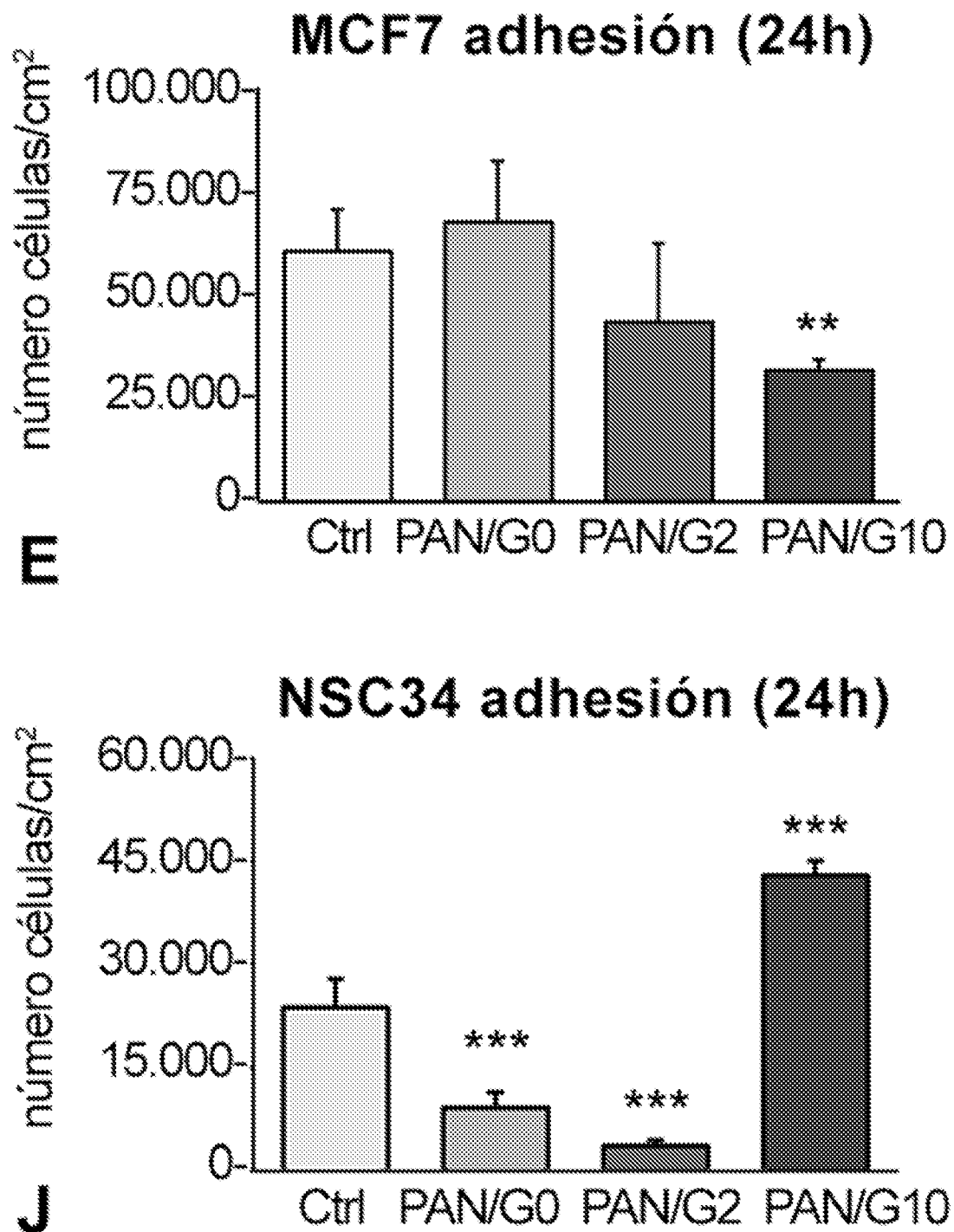


Fig. 7

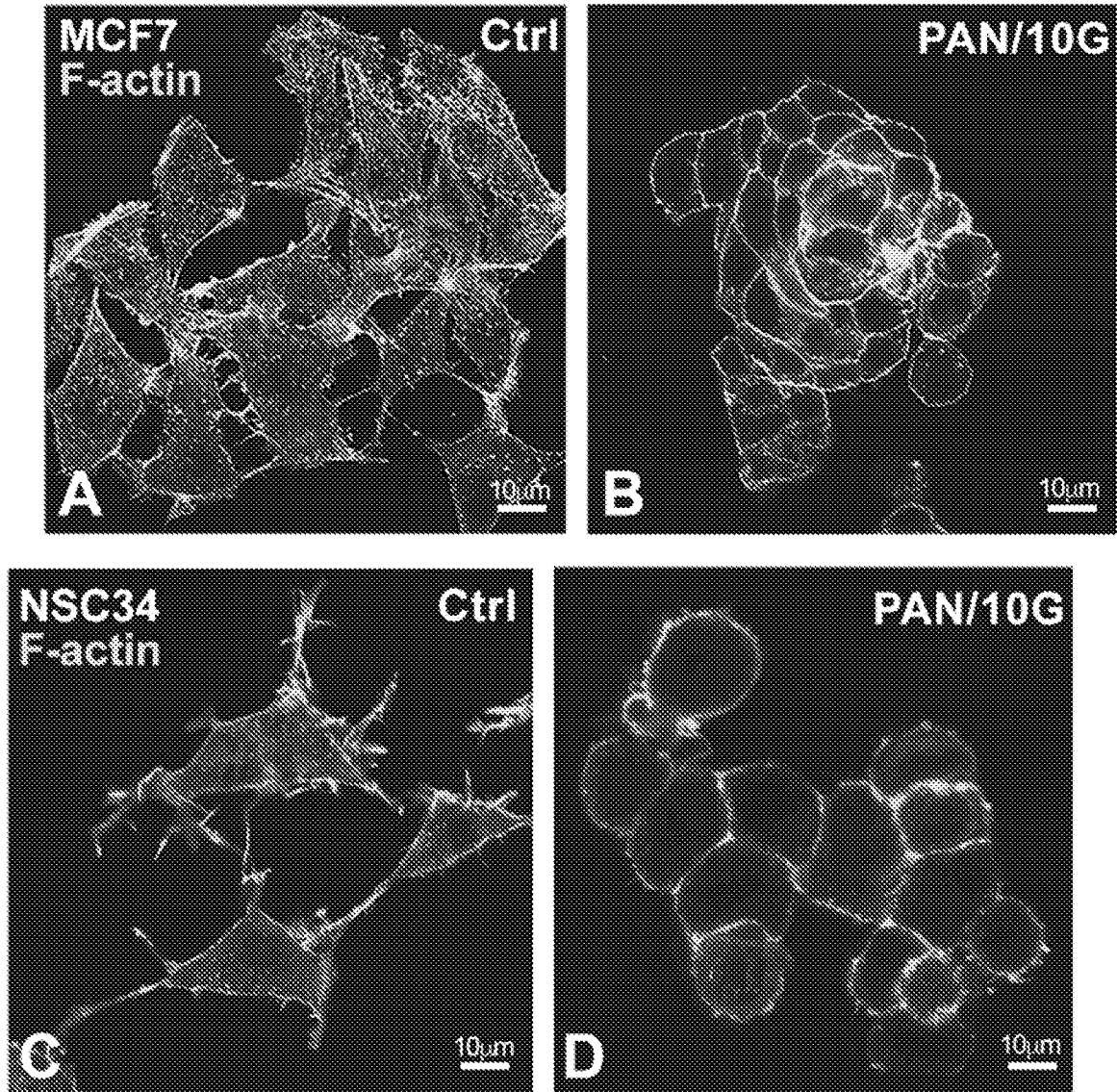


Fig. 7 Cont.

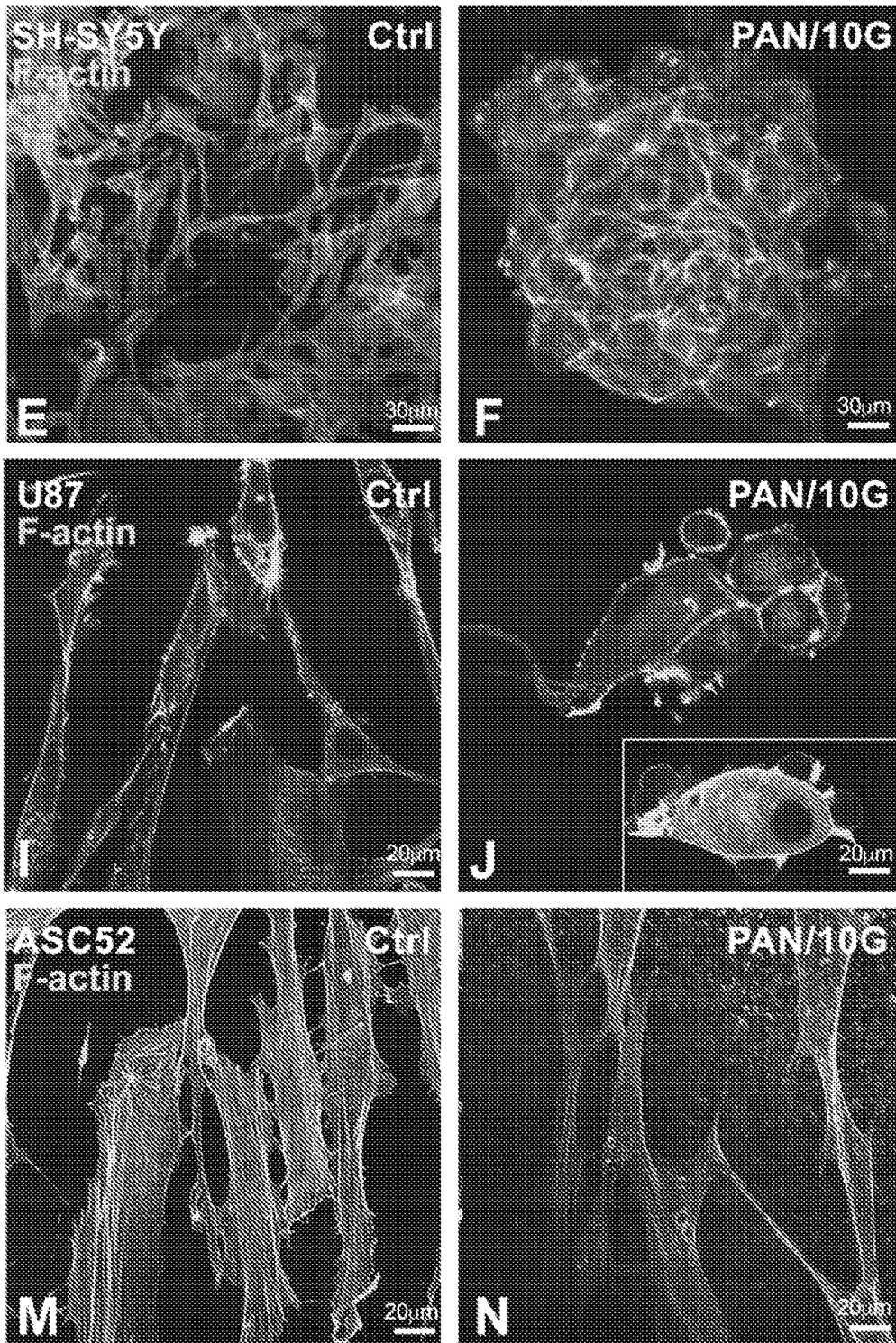


Fig. 7 Cont.

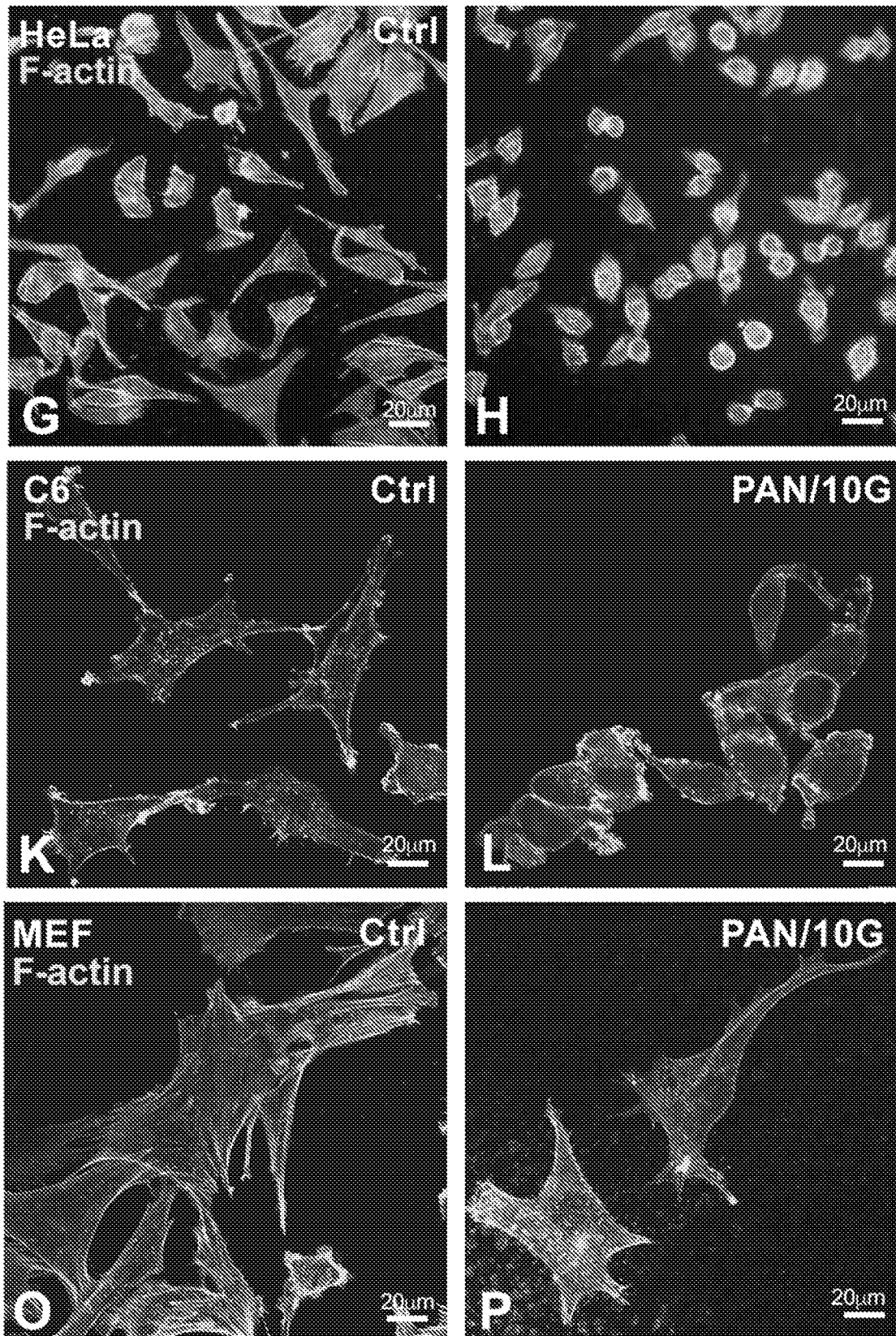


Fig. 8

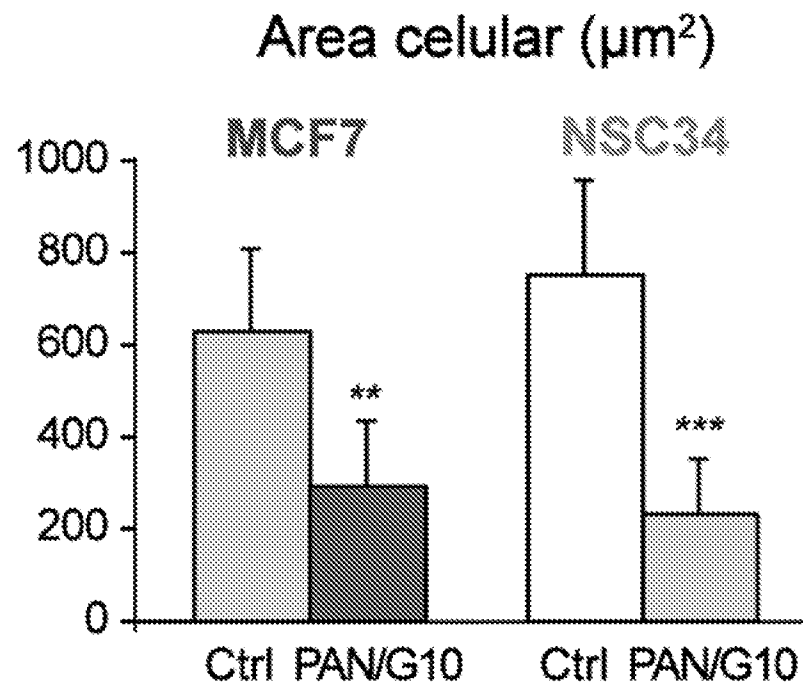
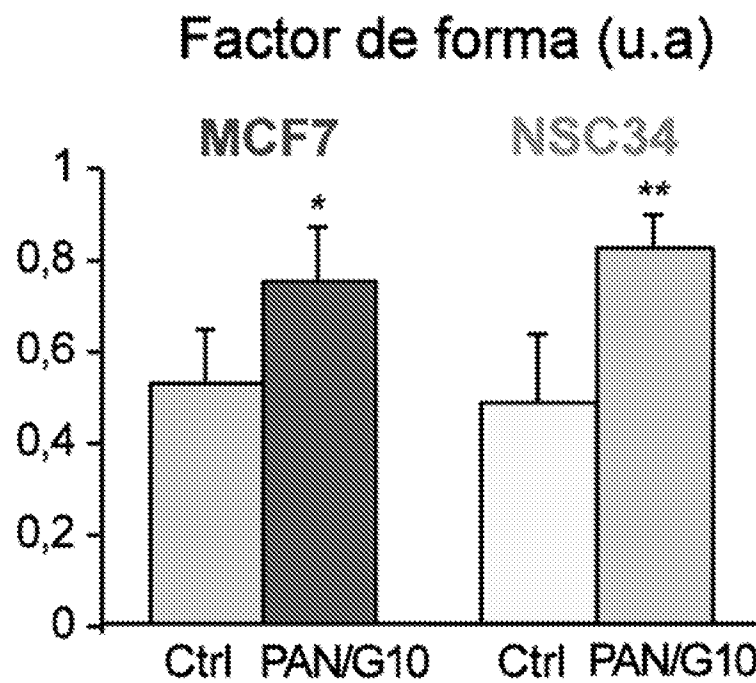
**A****B**

Fig. 9

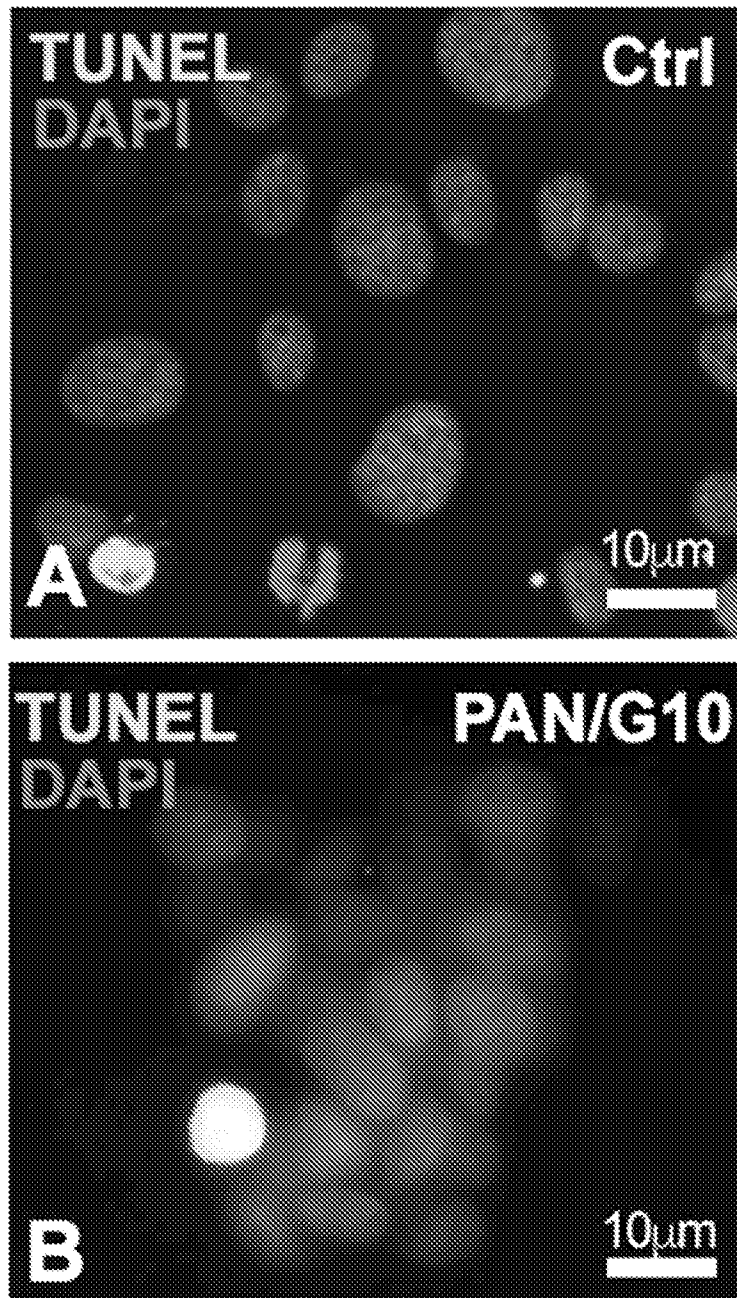
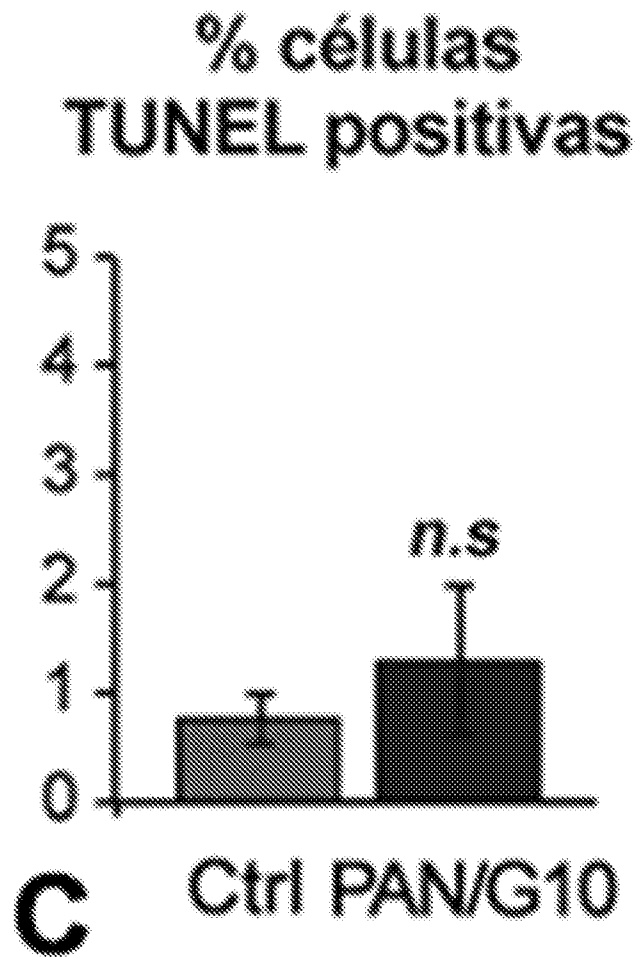


Fig. 9 Cont.



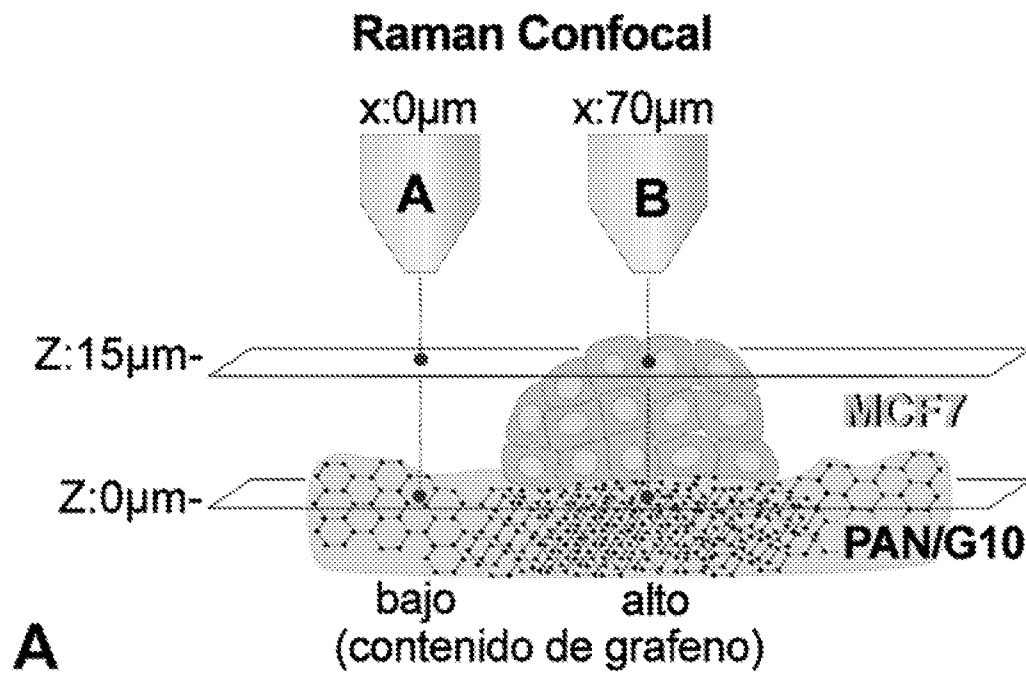


Fig. 10

Fig. 10 Cont.

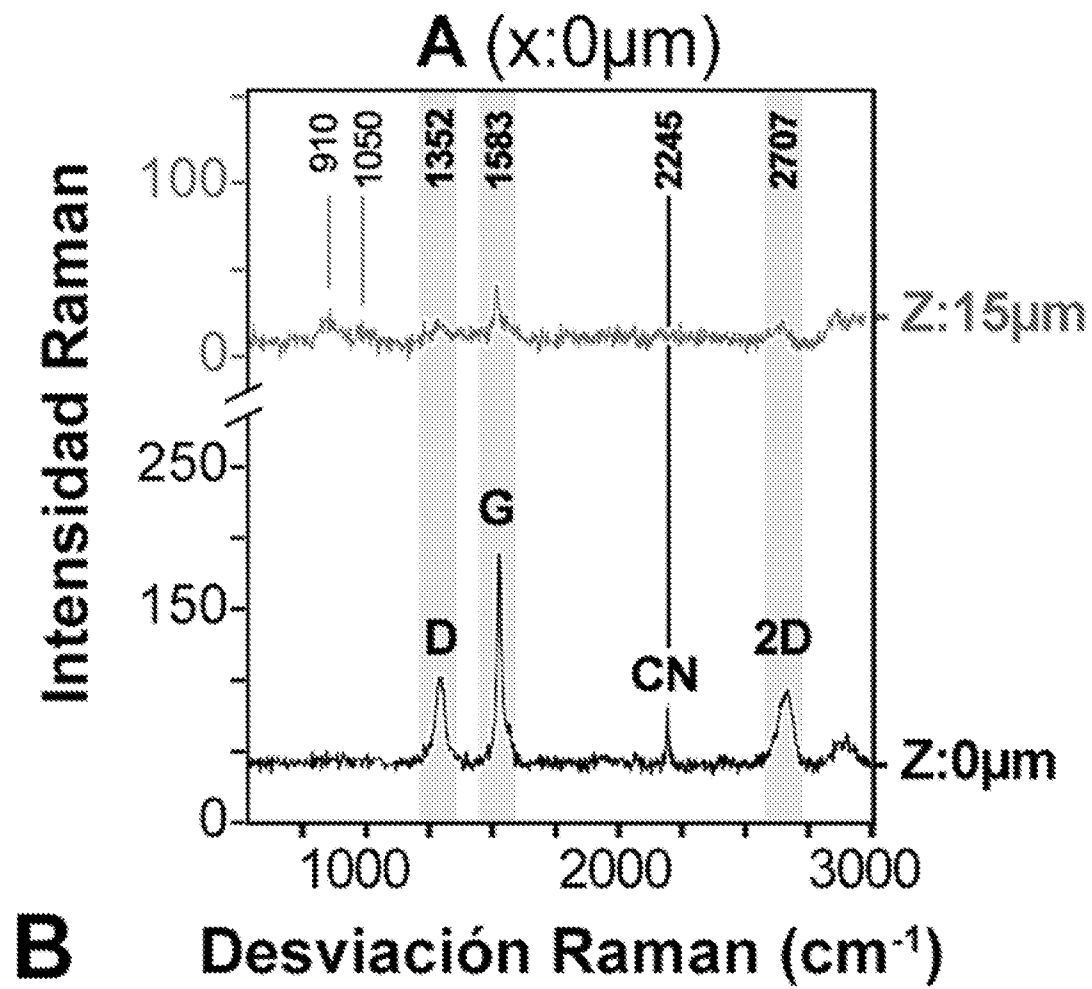


Fig. 10 Cont.

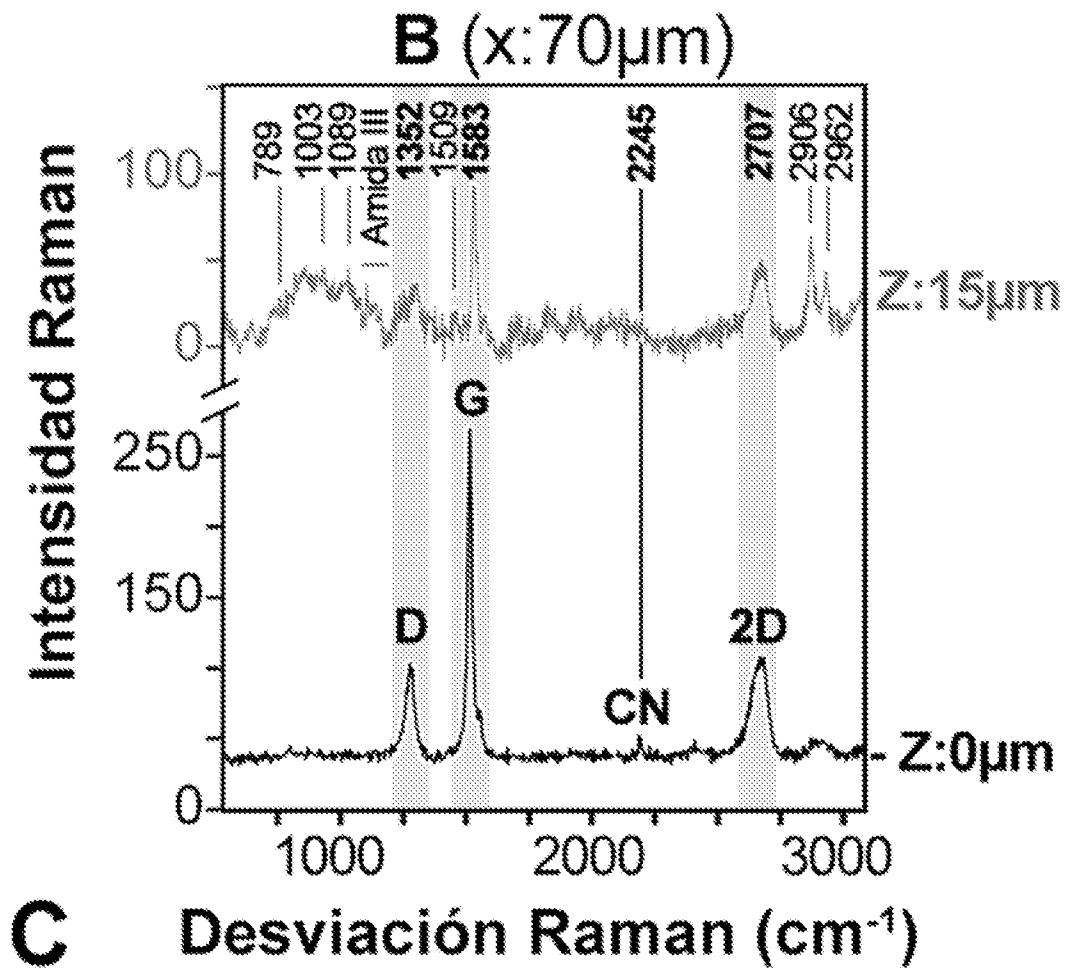


Fig. 11

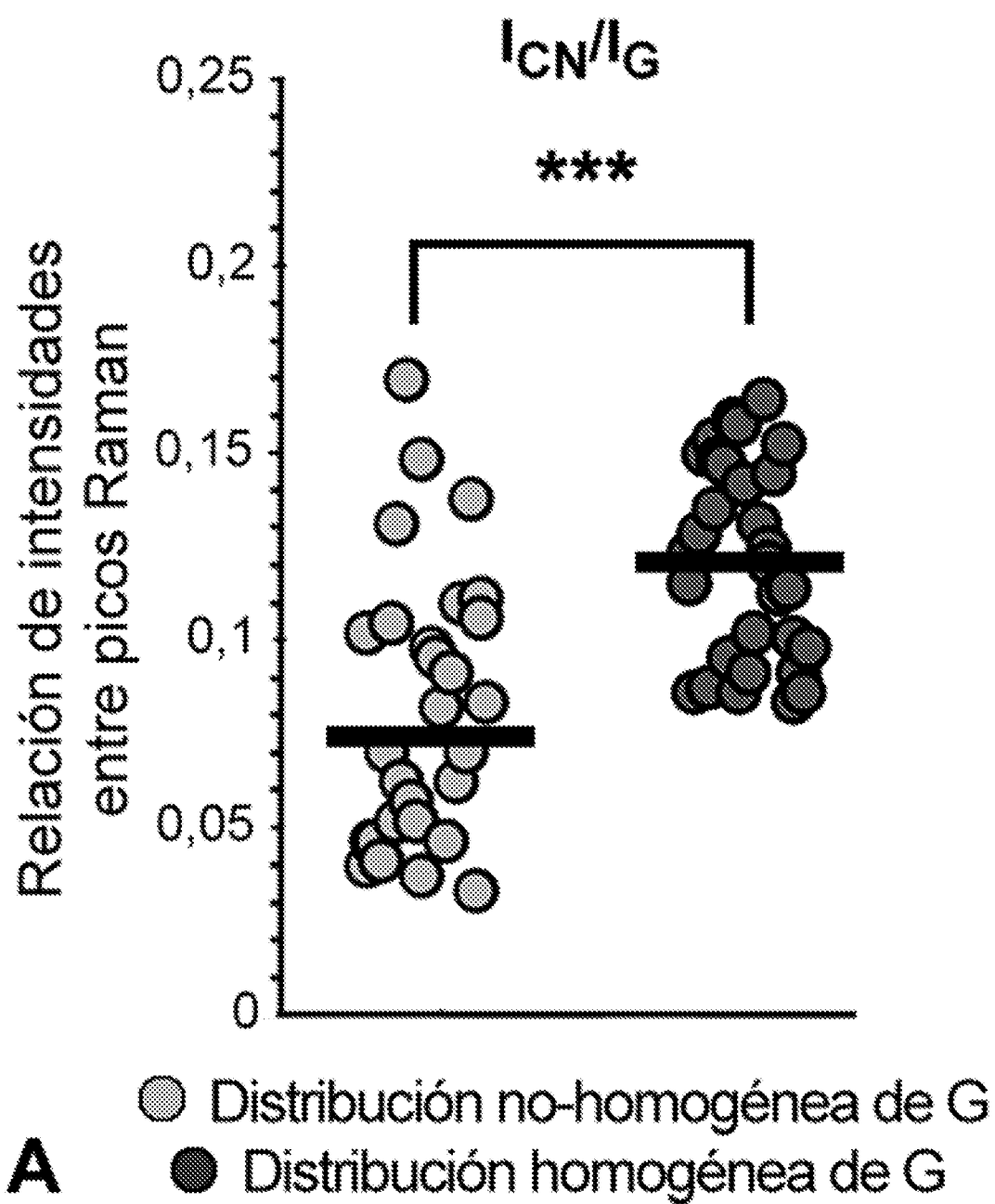


Fig. 11 Cont.

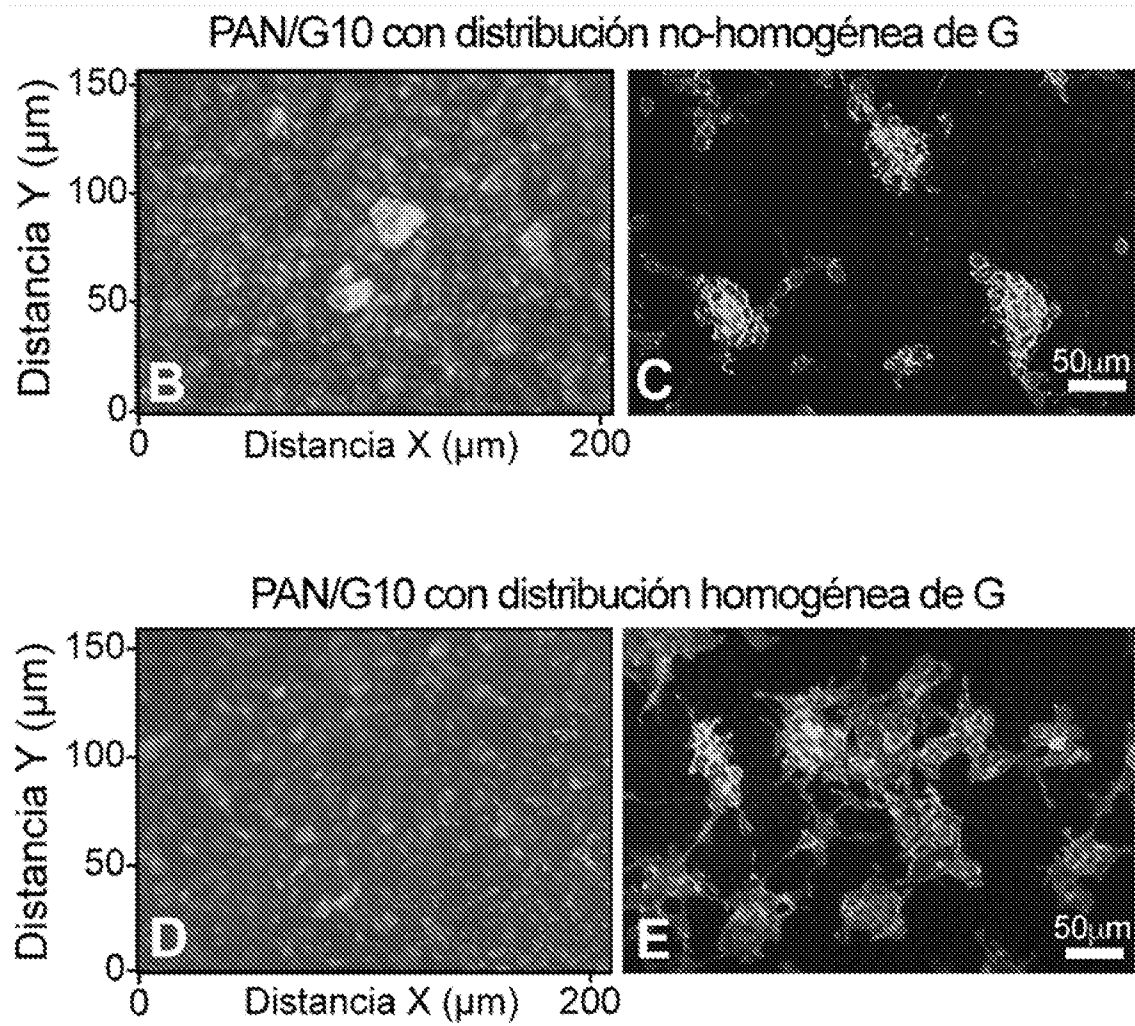


Fig. 12

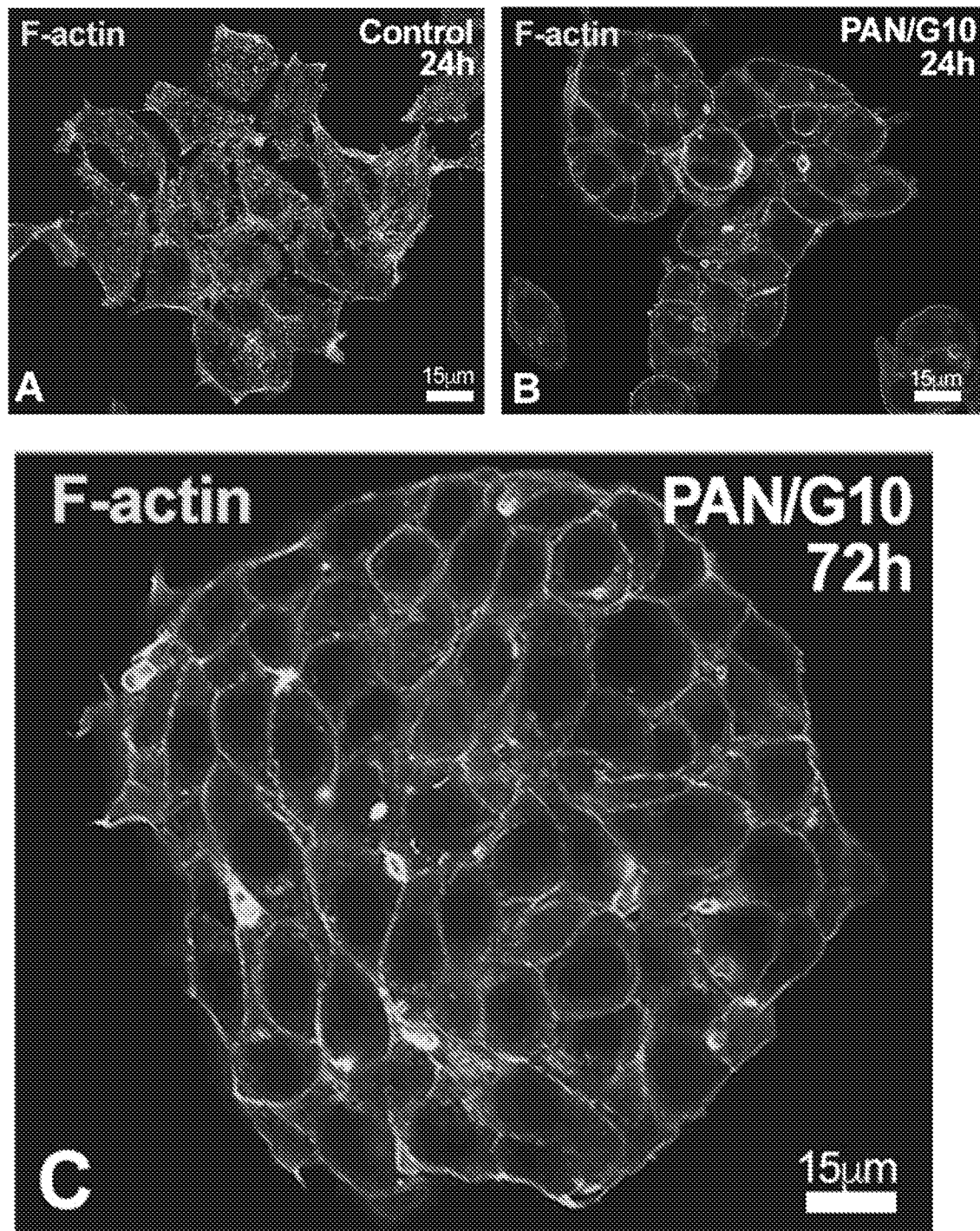


Fig. 12 Cont.

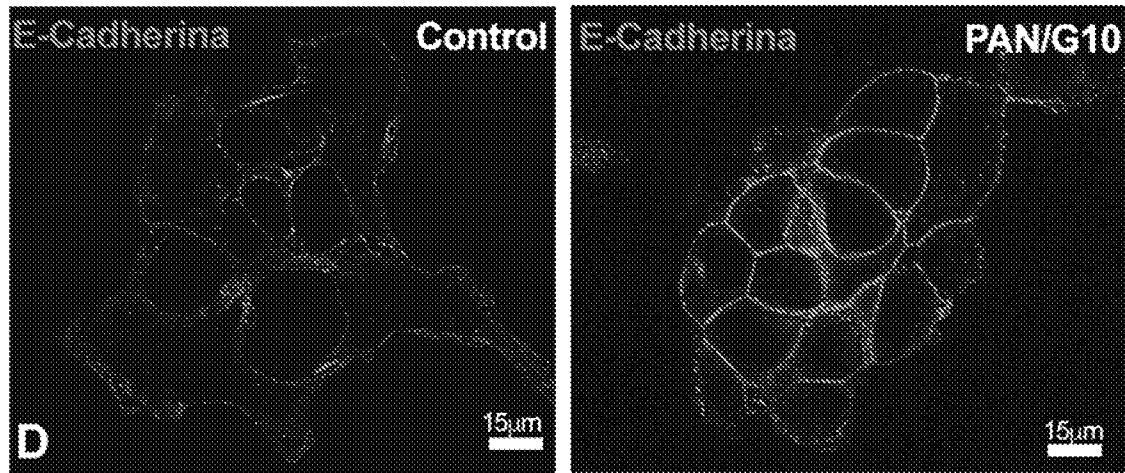


Fig. 13

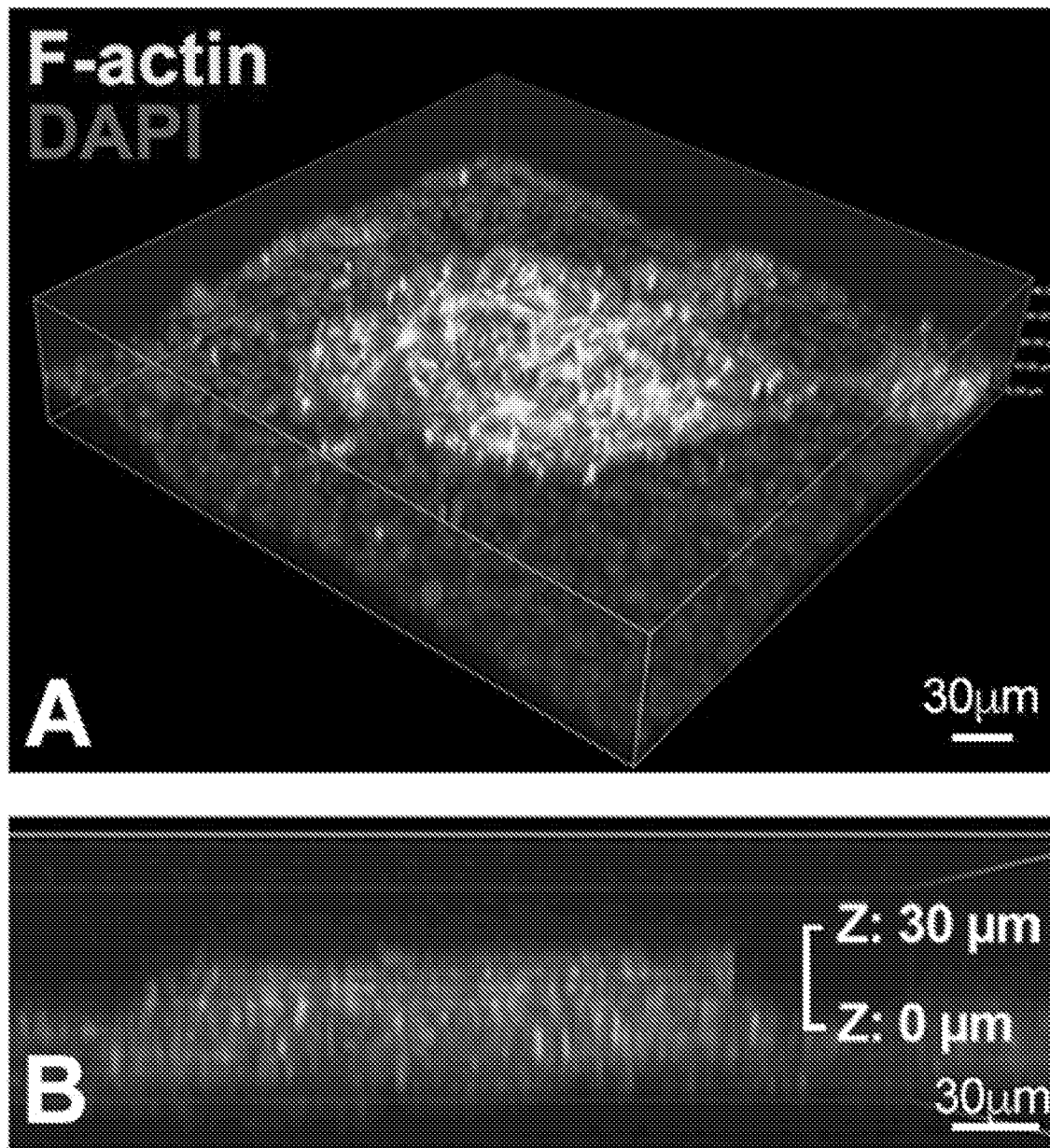
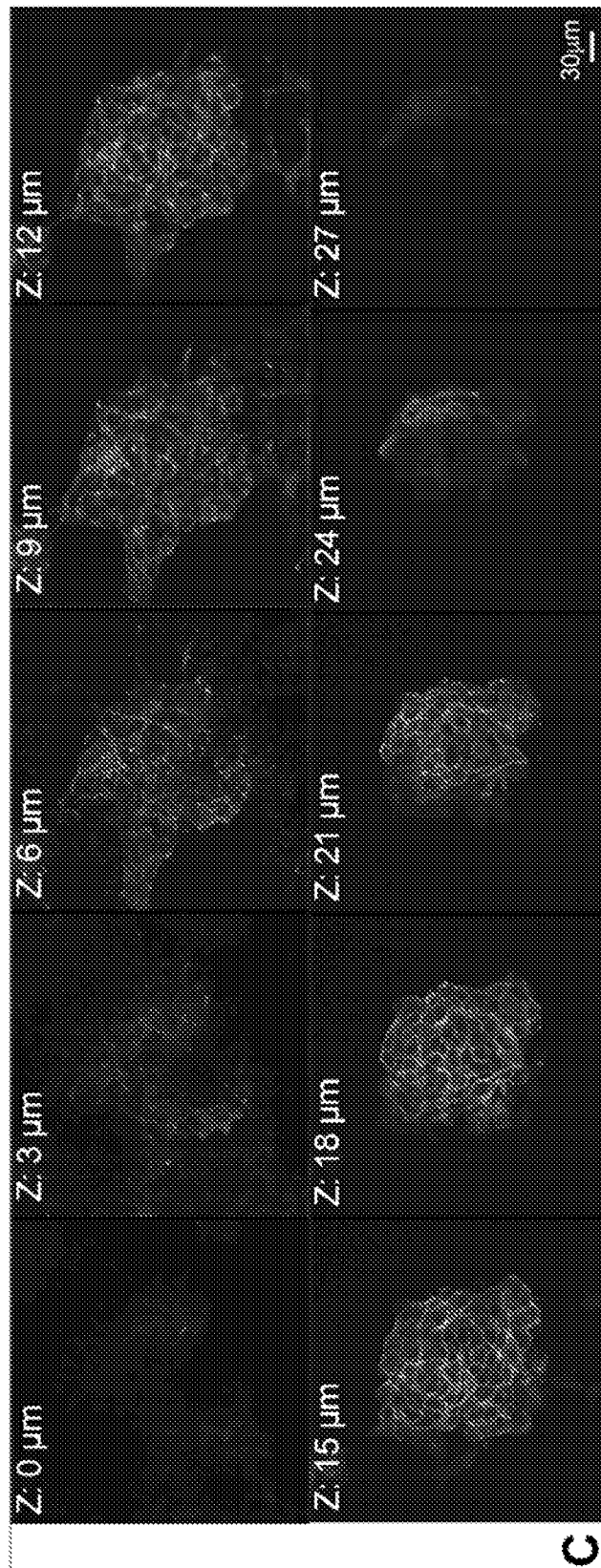


Fig. 13 Cont.



C

Fig. 14

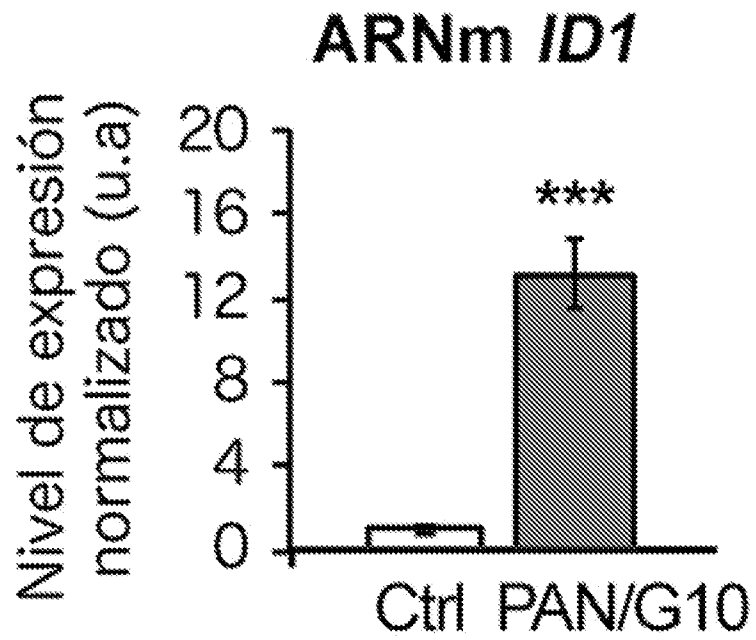


Fig. 15

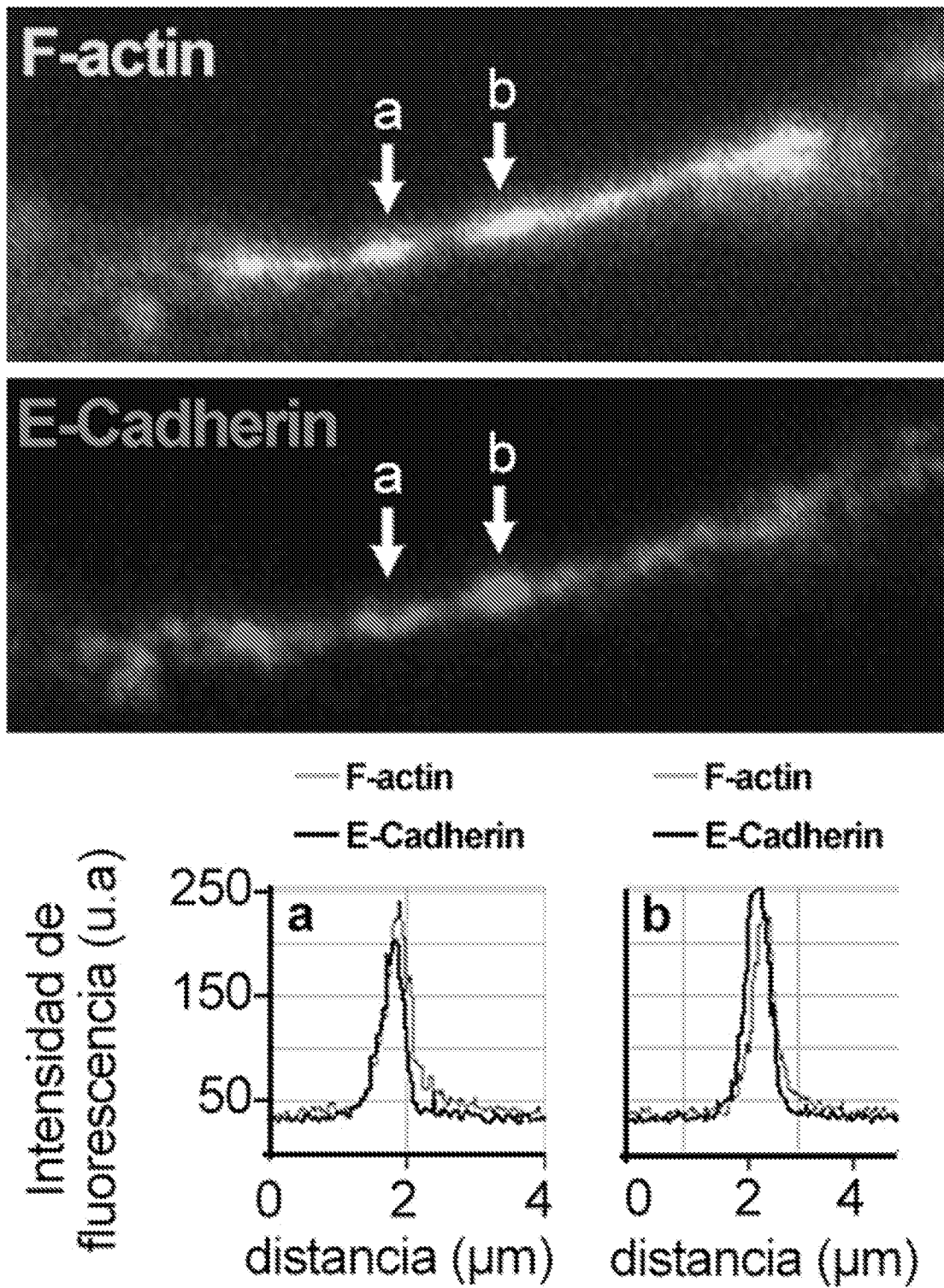


Fig. 16

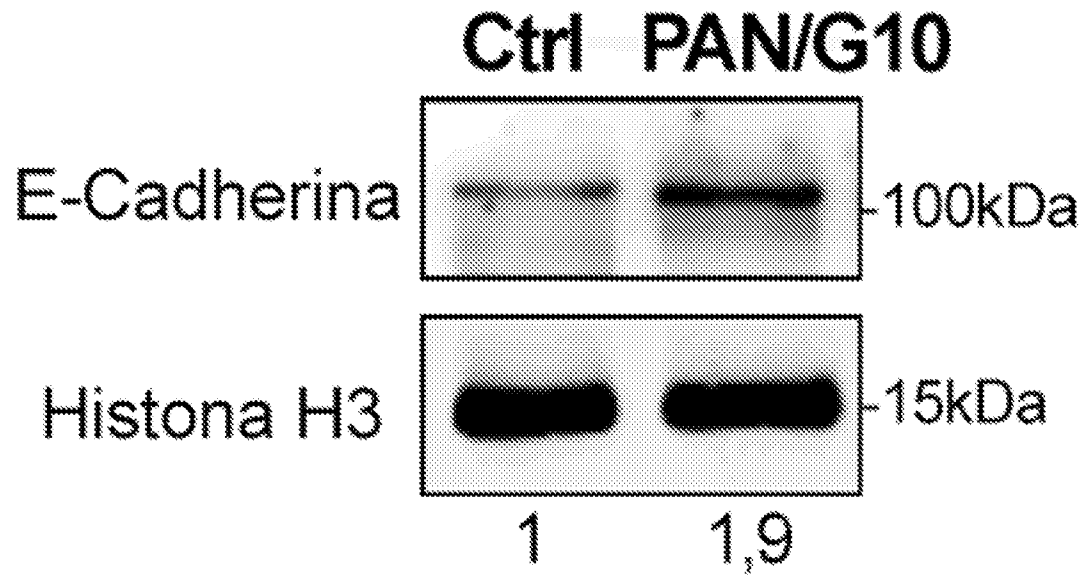


Fig. 17

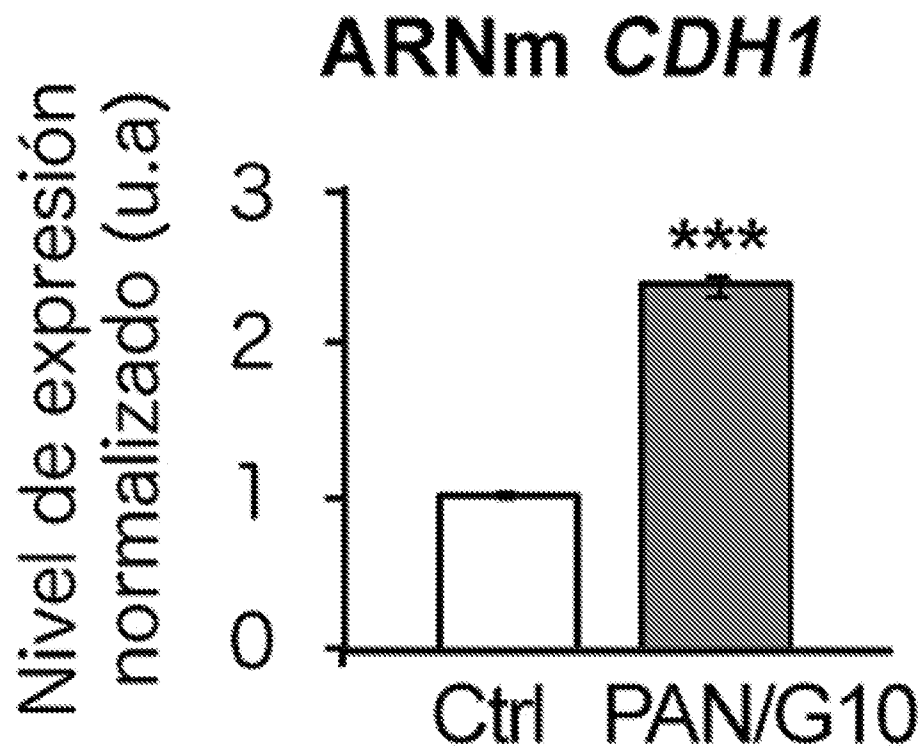


Fig. 18

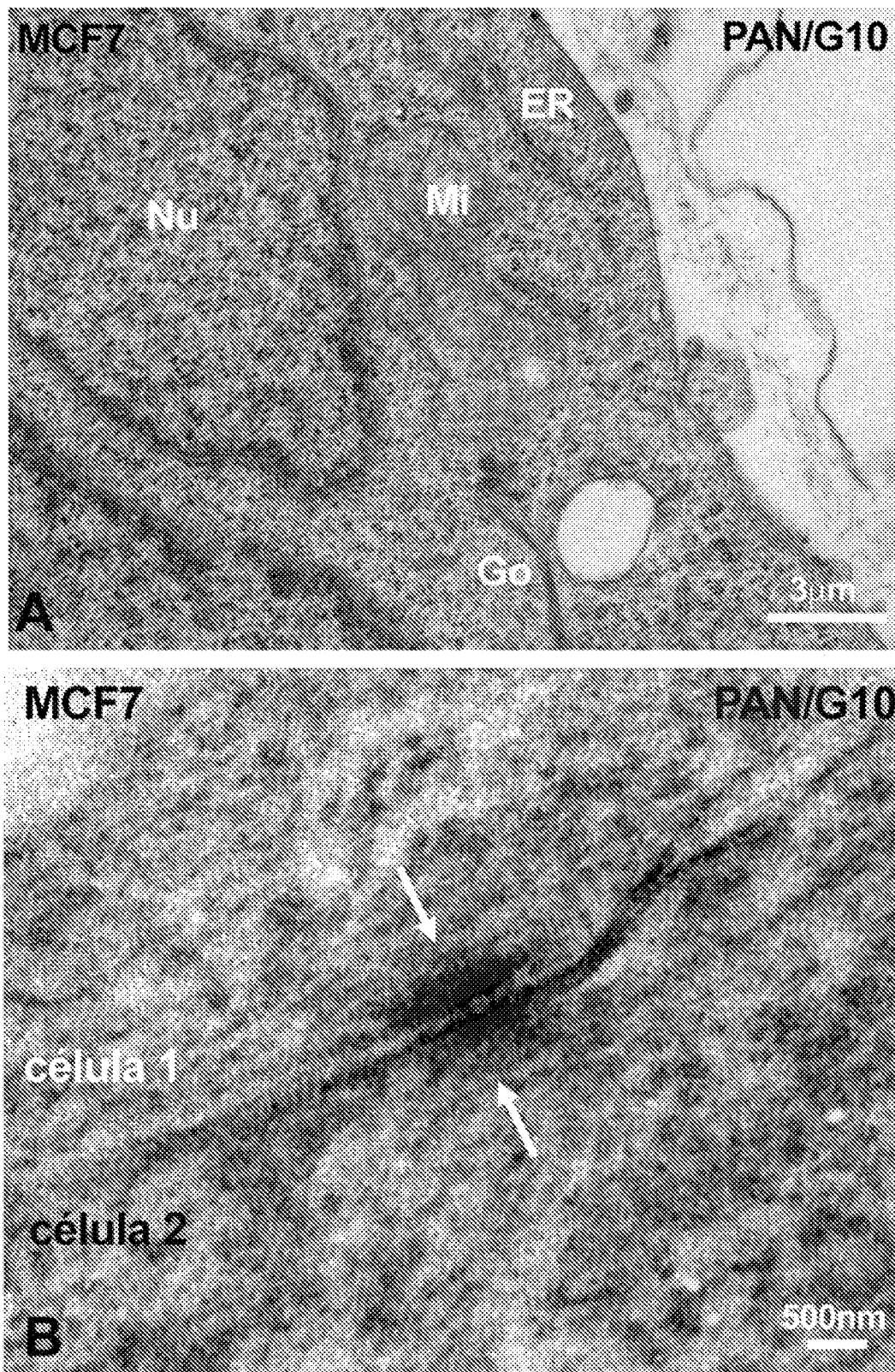


Fig. 19

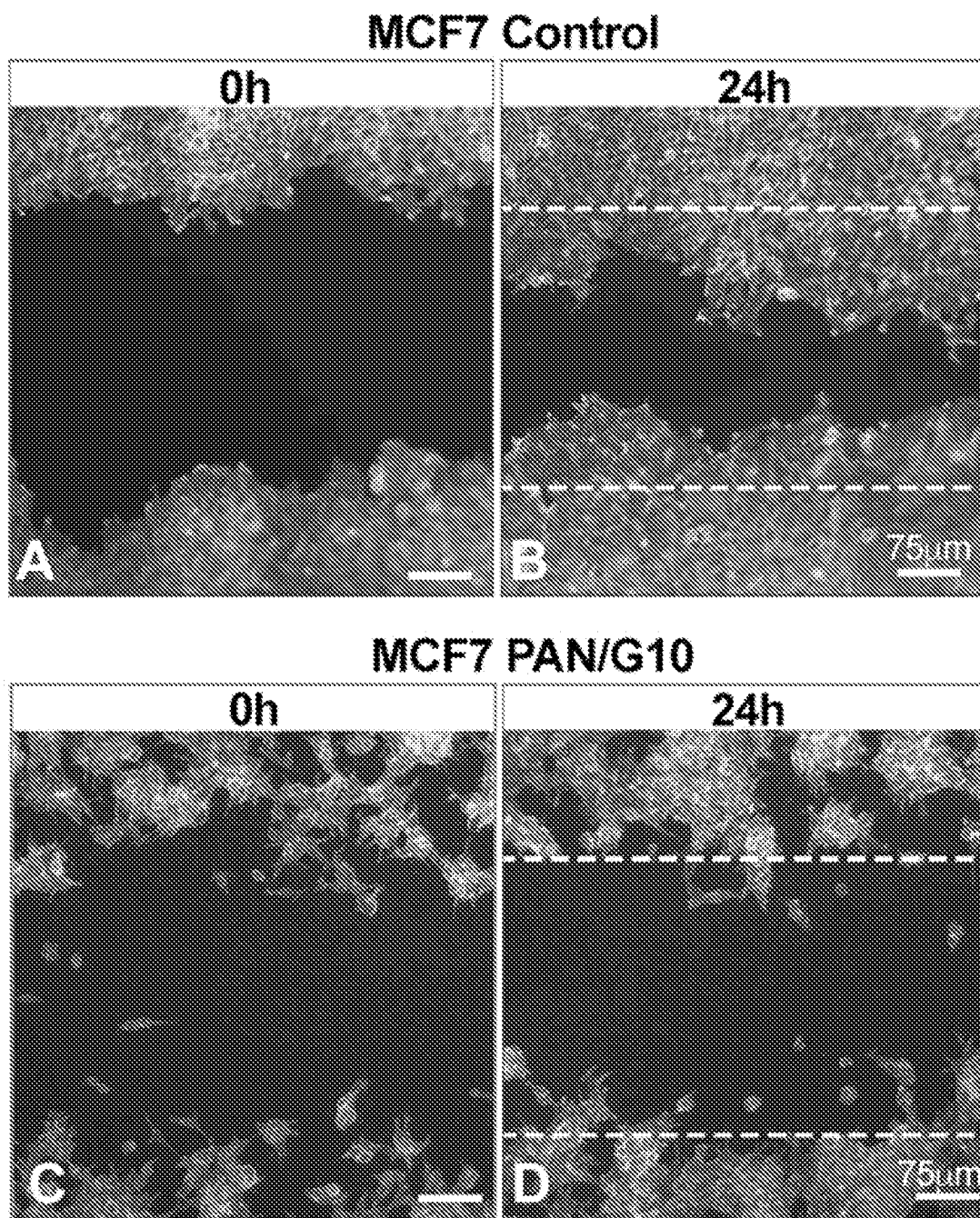


Fig. 20

