



**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

**GRADO DE MEDICINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**NANOMEDICINAS CONTRA EL CÁNCER**

**NANOMEDICINES AGAINST CANCER**

**Autor: Dña. Noemí Franco Domingo**

**Director/es: Mónica López Fanarraga**

**Lorena García-Hevia**

**Santander, Septiembre 2015**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
El Cáncer	5
El Citoesqueleto	6
Antineoplásicos contra el citoesqueleto	10
La Nanotecnología	12
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
Nanotubos de carbono multipared	16
Preparación de Nanotubos de carbono multipared: Funcionalización y Dispersión	16
Cultivo celular	17
Inmunofluorescencia	17
Microscopía de contraste de fases y Microscopía láser confocal	18
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
Los Nanotubos de carbono multipared penetran en las células HeLa y B16F10	19
Los Nanotubos de carbono multipared reducen la proliferación de las células HeLa y B16F10	20
La disminución en la proliferación celular de HeLa y B16F10 es dosis dependiente	21
Los Nanotubos de carbono multipared interfieren en la dinámica de los filamentos de actina provocando cambios en las células HeLa y B16F10	22
Redistribución de los filamentos de actina	22
Aumento del número de fibras de estrés	22
Cambios en la morfología celular	22

Cambios en el ciclo celular	25
Determinación del tiempo de división mediante microscopio de célula viva ( <i>Time-lapse</i> )	25
Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo	26
Próximos estudios	27
Posibles aplicaciones	27
<b>OBJETIVOS FUTUROS</b>	<b>28</b>
Optimización de las propiedades fisicoquímicas de los Nanotubos de carbono	28
Preparación de los Nanotubos de carbono	28
Dimensiones de los Nanotubos de carbono	28
Optimización de la actuación de los Nanotubos de carbono sobre las células tumorales	29
Marcaje de Nanotubos de carbono con anticuerpos monoclonales	29
Captación de Nanotubos de carbono por monocitos específicos	29
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>31</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>36</b>

## **RESUMEN**

El cáncer es una enfermedad de distribución mundial con cifras de morbimortalidad elevadas convirtiendo en una prioridad la investigación en este campo. Los microtúbulos y los filamentos de actina participan en la división celular por lo que son diana de las principales terapias antineoplásicas. La Nanotecnología es una ciencia en auge, en la que los nanomateriales están adquiriendo relevancia en la medicina. Los Nanotubos de carbono (*Carbon NanoTubes: CNT*) comparten propiedades estructurales con los elementos del citoesqueleto ejerciendo así un papel como estabilizadores de microtúbulos y filamentos de actina alterando el ciclo celular y modificando el fenotipo celular. Debido a las resistencias tumorales generadas por antineoplásicos tradicionales y el diferente mecanismo de acción de los *CNT*, estos se presentan como un grupo innovador de estabilizadores de microtúbulos que podrían emplearse como adyuvante antineoplásico. En este trabajo se investigó el efecto de la interacción de Nanotubos de carbono multipared (*Multiwalled Carbon NanoTubes: MWCNT*) con filamentos de actina en células tumorales HeLa y B16F10. Se observó que las células HeLa y B16F10 expuestas a *MWCNT* presentaron una disminución en la proliferación celular dosis dependiente. Se analizaron alteraciones fenotípicas por redistribución de los filamentos de actina, sugiriendo la interferencia de los *MWCNT* con la dinámica de los filamentos de actina. Estos datos indican un efecto antiproliferativo, antineoplásico y modulador fenotípico por parte de los *MWCNT* en ambas líneas celulares.

**Palabras clave:** Cáncer, Citoesqueleto, Actina, Nanotubos de carbono, Toxicidad

## **ABSTRACT**

As cancer is a worldwide disease with high morbimortality research in this field is a priority. Microtubules and actin filaments are implicated in cell division so they are the main target of anticancer therapies. Nanotechnology is a booming science, in which nanomaterials are gaining importance in medicine. The *CNT* share structural properties with cytoskeletal elements thereby exerting a role as microtubule- and actin filaments stabilizing agents triggering alterations in the cellular cycle and modifying cellular phenotype. Due to tumor resistance to traditional antineoplastic therapies and different action mechanism of *CNT*, these nanomaterials are presented as an innovative microtubule-stabilizing group that could be used as anticancer adjuvant.

In this work was investigated the *MWCNT* interaction with actin filaments effect in HeLa and B16F10 tumor cells. It was noticed that HeLa and B16F10 cells exposed to *MWCNT* showed a reduced cell proliferation dose-dependent. Phenotypic alterations because of redistribution of actin filaments was analyzed, suggesting *MWCNT* interference with actin filaments dynamic. These data prompt a *MWCNT* antiproliferative, antineoplastic and phenotypic modulator effect in both cell lines.

**Keywords:** Cancer, Cytoskeleton, Actin, Carbon nanotubes, Toxicity

## INTRODUCCIÓN

### EL CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de morbimortalidad en todo el mundo. De acuerdo con el Informe sobre el cáncer de 2014 de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), en 2012, a nivel mundial surgieron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes, y a nivel europeo se estimó una incidencia de 3,5 millones y una mortalidad de 1,8 millones (Figura 1). Y se calcula que se incrementará en un 70% la incidencia en los próximos 20 años. Estas cifras suscitan un gran interés en el campo de la investigación promoviendo el estudio patogénico de

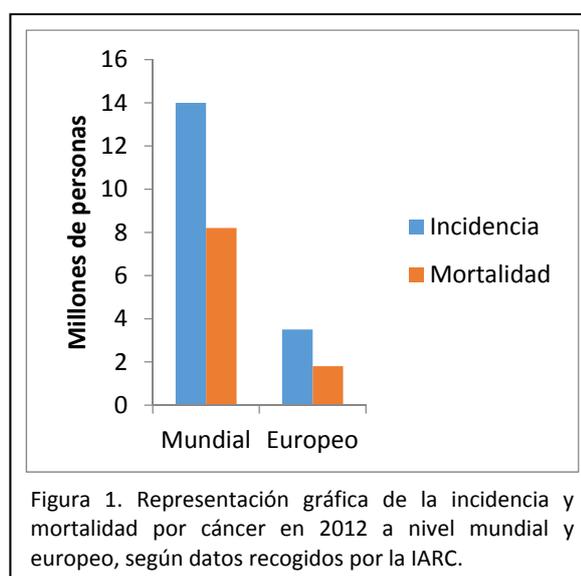


Figura 1. Representación gráfica de la incidencia y mortalidad por cáncer en 2012 a nivel mundial y europeo, según datos recogidos por la IARC.

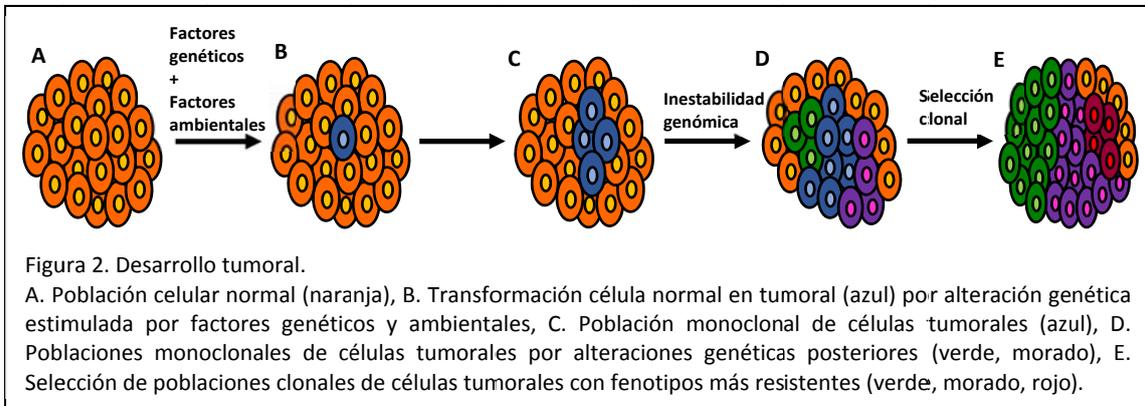
la enfermedad con objeto de desarrollar nuevos métodos preventivos, diagnóstico precoz y terapias individualizadas al tratarse de una enfermedad muy variable.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la existencia de una proliferación anormal de células con capacidad de invadir órganos y tejidos, y diseminarse a distancia vía hemática o linfática, esta propiedad denominada metástasis le otorga su carácter maligno. La base de esta enfermedad reside en la interacción de factores genéticos y ambientales de tipo físico, químico y/o biológico que conducen a la producción de un cúmulo de mutaciones en genes implicados en los mecanismos reguladores del funcionamiento, proliferación, diferenciación y muerte celular.<sup>1</sup>

El tumor se origina a partir de la alteración genética de una única célula normal que estimula su proliferación anormal generándose una población clonal a partir de ella. Posteriormente se producen progresivamente mutaciones en las células de dicha población tumoral pudiendo realizarse una selección de aquellos clones con los fenotipos celulares más resistentes dentro de la masa tumoral (Figura 2). Esta es una de las estrategias de adaptación de la masa tumoral inherente al proceso de transformación celular, que implica el desarrollo de resistencia a fármacos<sup>2</sup>. Esta es la razón por la que las terapias antineoplásicas basadas en actuar sobre genes o proteínas alterados suelen presentar una eficacia limitada ya que el cáncer acaba desarrollando resistencia a dichos tratamientos.<sup>2</sup>

Las principales características que diferencian las células cancerosas de las células normales se han ido convirtiendo en diana de los agentes antineoplásicos más utilizados en la actualidad. Dentro de estas características tumorales se encuentran la ausencia de inhibición de la proliferación dependiente de la densidad, la escasa diferenciación que permite una alta tasa de división celular, la ausencia de muerte celular programada o apoptosis.

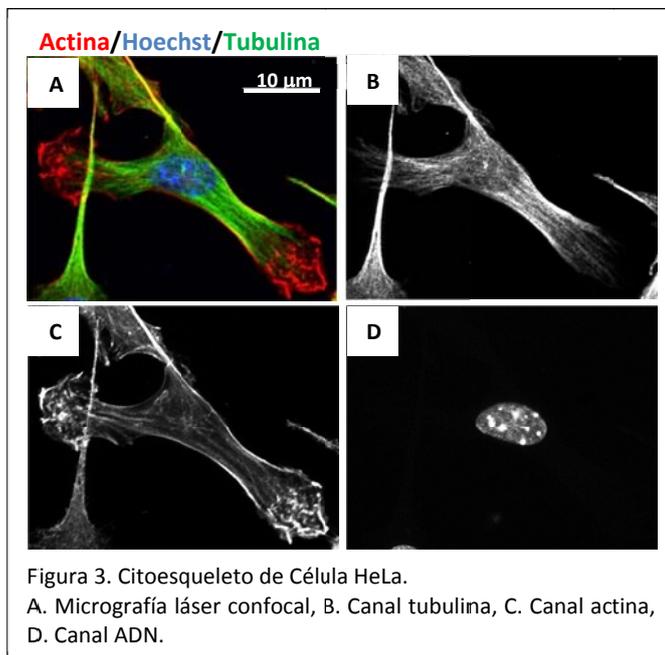
Independientemente de las mutaciones genéticas que llevan a la transformación tumoral de las células, la división celular es necesaria para la progresión del tumor, por lo que su bloqueo mediante la interferencia en la dinámica del citoesqueleto es un mecanismo fenotípico que a priori podría permitir tratar cualquier tipo de cáncer.<sup>4-6</sup>



## EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es una red tridimensional de filamentos proteicos que se extiende por el citoplasma de todas las células eucariotas. Se trata de una estructura dinámica que se reorganiza continuamente según la célula se mueve y cambia de forma. Está implicado en diversas funciones fundamentales para la célula, tales como su morfología, viscosidad citoplasmática, movimientos celulares internos y externos, y división celular, tanto en la cariocinesis donde participa en la separación de las cromátidas como en la citocinesis etapa en la que se divide el citoplasma.<sup>7</sup>

El citoesqueleto está compuesto por tres tipos de filamentos en las células eucariotas de mamíferos: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos que se unen a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática mediante proteínas accesorias (Figura 3).

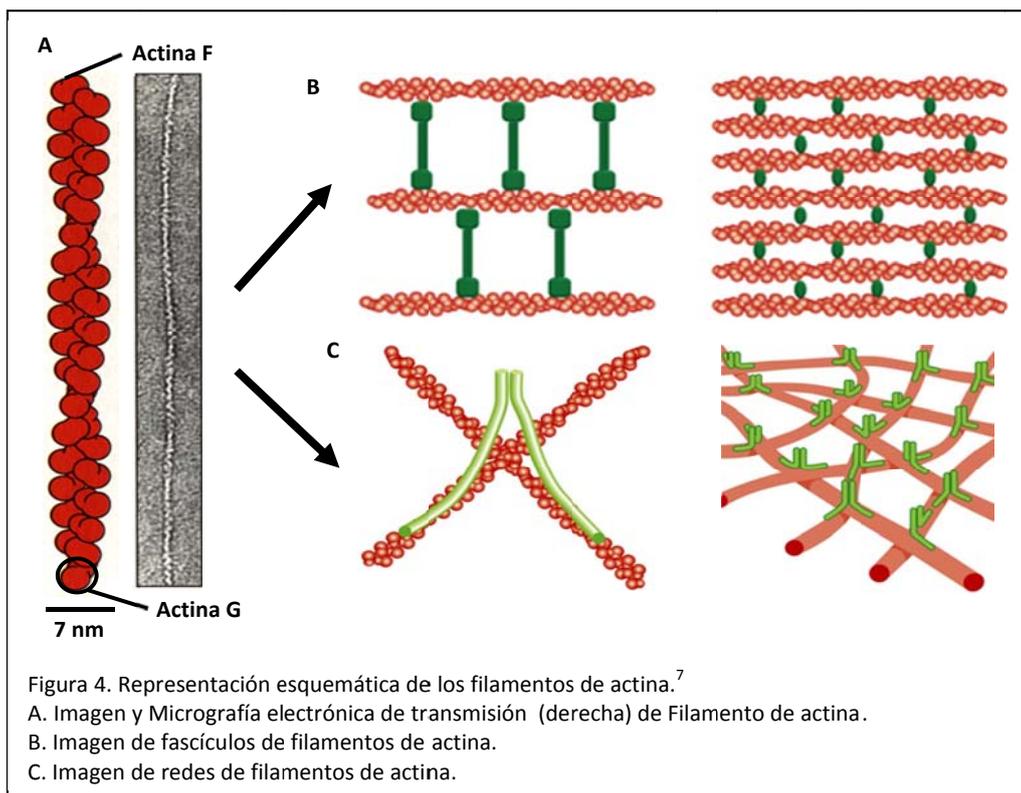


### Filamentos de actina

La actina es la proteína citoesquelética más importante de la mayoría de las células. Los filamentos de actina se forman a partir de monómeros, actina globular/G, proteína de 375 aminoácidos (43kDa). Cada monómero tiene sitios de unión que median la

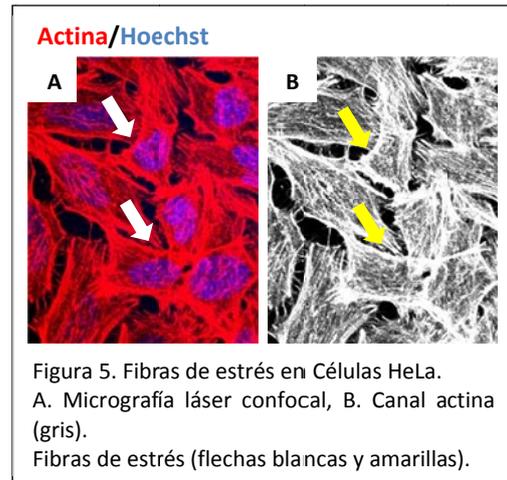
interacción cabeza con cola con otros dos monómeros de actina, de esta forma la actina G polimeriza formando filamentos, actina fibrilar/F. El filamento de actina se forma a partir de dos hebras de actina fibrilar enrolladas en espiral con un diámetro de 7 nm y longitud variable (Figura 4). Los filamentos de actina presentan polaridad debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, distinguiéndose un extremo (+) y un extremo (-). Asimismo, son capaces de crecer por adición reversible de monómeros a ambos extremos, siendo la polimerización en el extremo (+) cinco a diez veces más rápido que en el extremo (-).<sup>1</sup>

Dentro de la célula, los filamentos de actina se organizan formando fascículos o redes tridimensionales, que se localizan principalmente bajo la membrana plasmática en forma de red unida a proteínas que constituye el córtex celular (Figura 4). Esta estructura contribuye a establecer el fenotipo celular ya que proporciona un soporte mecánico, determina la forma celular y permite el movimiento de la superficie celular, pudiendo así llevar a cabo acciones como migración, fagocitosis o división. Otras funciones en las que participan los filamentos de actina incluyen el movimiento intracelular y el control de la citocinesis, en el cual participa formando un anillo contráctil junto con la miosina que divide el citoplasma en dos.



La Faloidina es una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides* que se une fuertemente a los filamentos de actina impidiendo su despolimerización. Se emplea en combinación con un marcador fluorescente para visualizar la distribución de los filamentos de actina mediante microscopía de fluorescencia.<sup>1</sup>

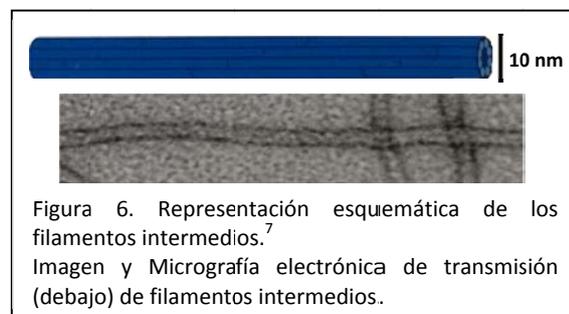
Las fibras de estrés son haces contráctiles de filamentos de actina, entrelazados por  $\alpha$ -actinina, que anclan a la célula ejerciendo tensión sobre el sustrato (Figura 5). Están unidas a la membrana plasmática en las adhesiones focales a través de la integrina, que también se utilizan para establecer contacto con células adyacentes, componentes tisulares y otros sustratos.<sup>1</sup>



### Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios están distribuidos en todas las células eucariotas, pero predominan en células neuronales y epidérmicas. Su función es principalmente estructural, proporcionando resistencia mecánica a las células y tejidos.

Los filamentos intermedios están constituidos a partir del ensamblaje de dos  $\alpha$ -hélices conformando dímeros helicoidales que se unen lateralmente formando tetrámeros en posición antiparalela. Los tetrámeros se unen por sus extremos dando lugar a protofilamentos de 2 nm que se unen lateralmente en profibrillas de 4 nm, y



por unión de cuatro profibrillas se forma el filamento intermedio de 10 nm de diámetro (Figura 6). Los filamentos intermedios se relacionan entre sí y con otras estructuras celulares mediante proteínas, formando fascículos y redes.<sup>1,7</sup>

Existe una gran variedad de filamentos intermedios en función de la proteína que los genera, expresándose específicamente en distintos tipos de células. Y a pesar de las diferencias en tamaño y secuencia de aminoácidos, presentan una organización estructural común.

### Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras altamente versátiles que intervienen en la morfología celular, la división celular y el movimiento intracelular y extracelular.<sup>2</sup>

Los microtúbulos se forman a partir del ensamblaje de los monómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina, que son proteínas globulares de 55 kDa, formándose el heterodímero  $\alpha\beta$ -tubulina, mientras que la  $\gamma$ -tubulina se localiza en el centrosoma donde interviene en el inicio del ensamblaje de los microtúbulos. Los dímeros se unen longitudinalmente formando los protofilamentos, los cuales se asocian lateralmente alrededor de un centro hueco en grupos de 13 protofilamentos constituyendo el microtúbulo de 25 nm de diámetro y longitud variable (Figura 7).<sup>1,7</sup>

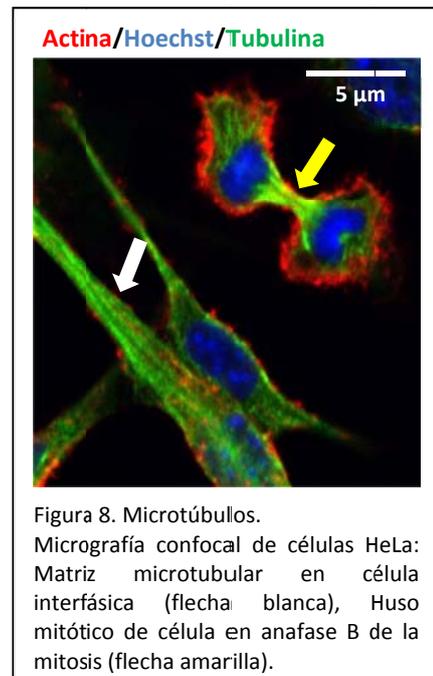
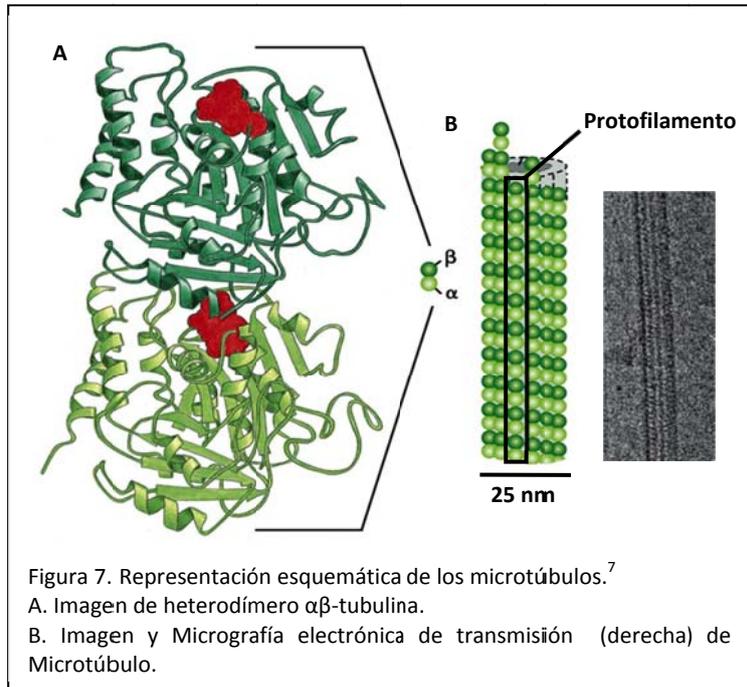
Debido a la organización de los protofilamentos, los microtúbulos adquieren una polaridad intrínseca con dos extremos diferenciados, un extremo (+) formado por un anillo de  $\beta$ -tubulina que es de crecimiento rápido y por tanto más dinámico, y otro extremo (-) formado por un anillo de  $\alpha$ -tubulina que es de crecimiento lento.<sup>8,9</sup>

La capacidad que presentan la mayoría de los microtúbulos para continuamente someterse a ciclos de polimerización y

despolimerización se conoce como inestabilidad dinámica, que permite su renovación continua y rápida, esencial para el remodelado del citoesqueleto durante la mitosis.<sup>1</sup>

El centro organizador de microtúbulos (COMT) es una estructura que como su nombre indica permite organizar los microtúbulos en interfase, así como formar el huso mitótico en la división celular, controlar el ensamblaje y polaridad de los microtúbulos. Existen dos estructuras que actúan como COMT, el centrosoma y los cuerpos basales.<sup>1</sup>

El centrosoma sirve como lugar de inicio del ensamblaje de los microtúbulos, los cuales se anclan a él a partir de sus extremos (-).<sup>1</sup> En la célula interfásica, el centrosoma se localiza cerca del núcleo y los microtúbulos se extienden hacia la periferia celular (Figura 8).<sup>1</sup> Esta organización centrosomal del citoesqueleto de microtúbulos genera un patrón radial de filamentos que es crucial para organizar el tráfico vesicular a nivel intracelular y la distribución de las organelas en la célula interfásica.<sup>10,11</sup> En la célula mitótica, los centrosomas se duplican para formar dos COMT separados en polos opuestos del huso mitótico, el cual se forma por despolimerización de la matriz microtubular de la interfase y reorganización del patrón radial de microtúbulos (Figura 8).<sup>2</sup> El huso mitótico es responsable, durante anafase de la mitosis, de la segregación y distribución de los cromosomas a las células hijas mediante la



separación y migración de las cromátidas hermanas a polos opuestos del huso.<sup>1</sup> En esta fase los microtúbulos son altamente dinámicos, de 20 a 100 veces mayor.<sup>12,13</sup>

## **ANTINEOPLÁSICOS CONTRA EL CITOESQUELETO**

De acuerdo con las funciones del citoesqueleto, la interferencia con su dinámica producirá importantes cambios en la morfología y división celular generándose aberraciones en el huso mitótico, aneuploidías o multinucleación, que pueden conducir a la muerte celular. Razón por la cual, son diana de múltiples agentes antineoplásicos tradicionales, con un amplio rango de tumores frente a los que son eficaces.<sup>14</sup> A pesar de que los fármacos dirigidos contra el citoesqueleto de actina suponen una gran promesa por su efecto bloqueante de la migración y proliferación celular no consiguen superar los ensayos preclínicos debido a la incapacidad de discriminar entre el citoesqueleto de actina de las células tumorales del de las células musculares sanas generando una gran cantidad de efectos secundarios.<sup>15-18</sup> Sin embargo, los fármacos que actúan sobre el citoesqueleto de microtúbulos son una herramienta fundamental en la terapia contra el cáncer.

La forma de actuación de los antineoplásicos sobre el citoesqueleto de microtúbulos consta de dos fases. En una primera fase, el fármaco interfiere con los microtúbulos como agente desestabilizador o estabilizador de microtúbulos inhibiendo el correcto alineamiento de los cromosomas en metafase y el ensamblaje del huso mitótico, bloqueando así la célula en metafase.<sup>3-6</sup> Y en una segunda fase interviene el Punto de control del ensamblaje del huso mitótico (*Spindle Assembly Checkpoint: SAC*), se trata de un mecanismo que controla que se produzca el correcto alineamiento de los cromosomas en metafase con el fin de evitar la inestabilidad genómica y la aneuploidía, por ello al producirse anomalías en la mitosis el SAC permanece activado de forma prolongada desencadenando la muerte celular por apoptosis u otros mecanismos, fenómeno conocido como catástrofe mitótica,<sup>4</sup> que implica la destrucción de las células tumorales.

Los fármacos antineoplásicos que interfieren con la dinámica de los microtúbulos se pueden clasificar según su mecanismo de acción en dos familias.<sup>2</sup>

**Agentes desestabilizadores de microtúbulos o inhibidores de polimerización de microtúbulos.** Son la colchicina y análogos como los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y vinflunina).

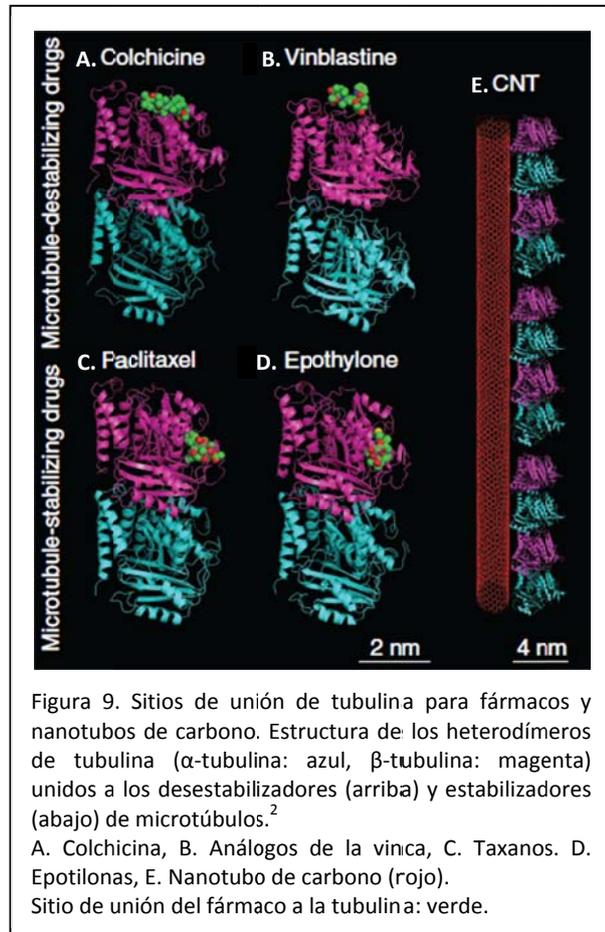
Estos agentes se unen al monómero  $\beta$ -tubulina produciendo cambios conformacionales en el heterodímero  $\alpha\beta$ -tubulina que impiden su polimerización para formar el protofilamento de tubulina (Figura 9. A, B).<sup>2</sup> Su efecto final es el desensamblaje de la matriz de microtúbulos interfásica y el bloqueo de la división celular en metafase, produciéndose la muerte celular.<sup>19</sup> Este grupo de antineoplásicos puede emplearse de forma aislada o en combinación con otros tratamientos.

**Agentes estabilizadores de microtúbulos o inhibidores de despolimerización de microtúbulos.** Son los taxanos (paclitaxel, docetaxel y cabazitaxel), de los cuales el paclitaxel, comercialmente denominado Taxol® es el quimioterápico prototipo.

Estos agentes interactúan con un bolsillo lateral de la  $\beta$ -tubulina polimerizada (Figura 9. C) produciéndose cambios estructurales en el heterodímero de tubulina que estabilizan el protofilamento e inhiben la despolimerización del microtúbulo.<sup>2</sup> En consecuencia se forman en interfase, microtúbulos más cortos y estables; y en mitosis, husos mitóticos aberrantes que conducen a la apoptosis por detención del ciclo celular en la fase de transición G2/M.<sup>20</sup> Los taxanos son activos frente a una gran variedad de tumores y pueden utilizarse con radioterapia neoadyuvante.

Otro agente estabilizador de microtúbulos son las epotilonas, que se unen al mismo sitio de la  $\beta$ -tubulina (Figura 9. D).<sup>21</sup> Aunque todavía se encuentran en fase de estudio, los ensayos clínicos realizados han demostrado una potente actividad citotóxica, incluso en cánceres refractarios a taxanos, y con menos efectos secundarios.<sup>22</sup>

Sin embargo, son dos los principales elementos que pueden conducir a la resistencia tumoral frente a los quimioterápicos en general. En primer lugar, las células cancerosas desarrollan mecanismos para evitar los efectos del antineoplásico; y en segundo lugar, la quimioterapia actúa como un medio de selección eliminando las células tumorales no resistentes y permitiendo la supervivencia y el crecimiento de aquellas células tumorales que evaden el efecto del fármaco.<sup>2</sup>



Los mecanismos tumorales de resistencia frente a los agentes que interfieren con los microtúbulos se basan en mutaciones o modificaciones post-traduccionales en el sitio de unión del fármaco a la tubulina, cambios en las proteínas reguladoras de microtúbulos y modificación de las vías de señalización para acortar o promover un SAC débil. Cuando el SAC se debilita, se inactiva a pesar de las anomalías en la mitosis produciéndose una salida precoz de ella por un mecanismo denominado deslizamiento mitótico, evitando de esta forma el efecto apoptótico del fármaco.<sup>23</sup>

Las halicondrinas son unos compuestos también dirigidos contra los microtúbulos, que actualmente están siendo estudiadas con el propósito de superar la resistencia a los quimioterápicos mencionados. Sin embargo, la inestabilidad genómica inherente al cáncer es un proceso activo que promueve la evolución del tumor hacia la resistencia.<sup>2</sup>

Por ello es esencial continuar la búsqueda de nuevos tratamientos, que se combinen o sustituyan a los fármacos tradicionales en su lucha por erradicar las células del cáncer.

Actualmente, los expertos opinan que la mejor forma de evadir la resistencia tumoral a estos fármacos y mejorar su efecto citotóxico sería obstaculizar la salida de mitosis aguas abajo del SAC inhibiendo así el deslizamiento mitótico.<sup>24</sup>

Los nanomateriales se postulan como una de las mejores alternativas, ya que emplean estrategias muy diferentes a los fármacos convencionales.

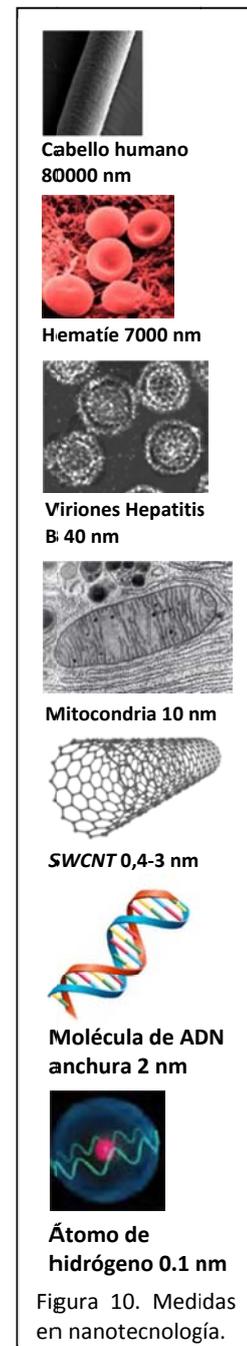
## LA NANOTECNOLOGÍA

La Nanotecnología es la ciencia que estudia el desarrollo y funcionalidad de todo material cuyo tamaño sea nanométrico, en la escala de 1 a 100 nm, siendo un nanómetro equivalente a la mil millonésima parte de un metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) (Figura 10).<sup>25</sup> Existe una gran variedad de nanomateriales, algunos de ellos son los nanotubos de carbono, dendrímeros, fulerenos, nanopartículas de óxido de zinc, etc; que en función de sus propiedades intrínsecas son empleados con diferentes fines.

Esta ciencia está siendo aplicada en muy diversos campos como medicina, medio ambiente, energía, comunicación e industria, con resultados prometedores.

La aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud ha permitido la creación de una nueva disciplina, la Nanomedicina. En ella, a partir de la interacción molecular a nivel nanométrico entre biomateriales y elementos intracelulares, se obtienen efectos celulares y tisulares, cuyo objetivo final es la creación de herramientas para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, preferiblemente en estadios precoces.<sup>25</sup> Actualmente las principales líneas de trabajo de la nanomedicina se centran en el diagnóstico precoz, el desarrollo de fármacos y la regeneración tisular.

Una de las enfermedades en las que se están estudiando la potencial aplicación de la nanoterapia es el cáncer. Su principal ventaja respecto otros tratamiento antineoplásicos es que no requiere un gen o proteína sobre la que actuar para destruir la célula, por lo que la resistencia tumoral basada en adaptaciones genéticas que permite evadir la acción de los habituales antineoplásicos no afectan a los nanomateriales. Concretamente, uno de los nanomateriales con los que se están trabajando y que está mostrando resultados prometedores a nivel preclínico son los nanotubos de carbono<sup>2</sup>.



## Los Nanotubos de Carbono

Los Nanotubos de carbono (*Carbon NanoTubes: CNT*) son estructuras tubulares de diámetro nanométrico compuestas de una, dos o múltiples láminas de grafeno enrolladas, dependiendo de su proceso de fabricación;<sup>26</sup> y se mantienen unidos mediante fuerzas de Van der Waals, lo cual les proporciona flexibilidad.<sup>27</sup>

Se pueden clasificar en dos tipos. Los Nanotubos de carbono de pared simple (*Singlewalled Carbon NanoTubes: SWCNT*), constan de una única capa de grafeno enrollada con un diámetro de 0.4-3.0 nm y una longitud de 20-1000 nm (Figura 11).<sup>26</sup>

Los Nanotubos de carbono multipared (*Multiwalled Carbon NanoTubes: MWCNT*), están compuestos por varios cilindros coaxiales, cada uno formado por una sola capa de grafeno, y equidistantes entre ellos, presentan un diámetro externo de 2-100 nm e interno de 1-3 nm con una longitud de 1 a varios  $\mu\text{m}$  (Figura 11).<sup>26</sup>

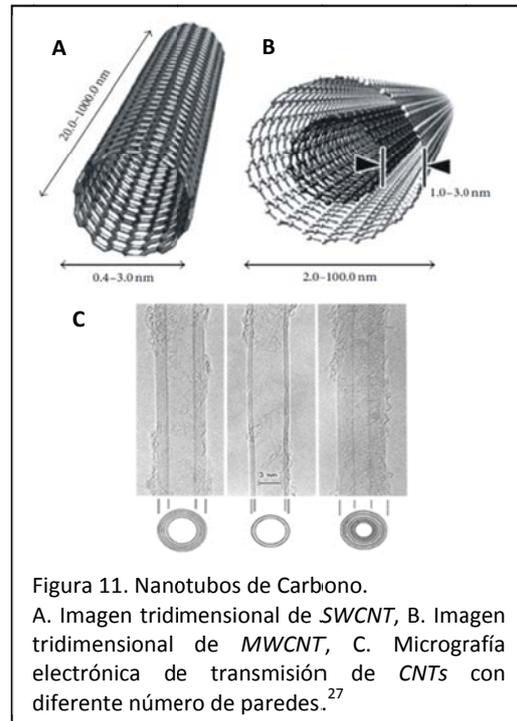


Figura 11. Nanotubos de Carbono. A. Imagen tridimensional de *SWCNT*, B. Imagen tridimensional de *MWCNT*, C. Micrografía electrónica de transmisión de *CNTs* con diferente número de paredes.<sup>27</sup>

Los *CNT* son un material prometedor para su empleo en el área de la nanomedicina debido a propiedades como su composición carbonada, compatibilidad química, capacidad de penetrar en tejidos y membranas celulares de mamíferos, carácter no reactivo y resistente a ácidos, bases y enzimas celulares, capacidad para interferir con los mecanismos celulares biomecánicos, de proliferación y movimiento celular y capacidad de transportar fármacos, nanopartículas o ácidos nucleicos dentro de las células<sup>2</sup>.

Los microtúbulos y los *CNT* comparten muchas propiedades, tales como su estructura y morfología, ya que ambos son fibras nanométricas huecas de dimensiones similares que se auto-ensamblan, de elevada flexibilidad y resistencia (Figura 12).<sup>28,29</sup> La principal diferencia entre ambos elementos reside en su comportamiento, mientras que los microtúbulos son muy dinámicos, los *CNT* son muy estables. Este conjunto de propiedades son las que permiten la interacción longitudinal entre los *CNT* y los microtúbulos (Figura 9. E); *in vitro*, dando lugar a polímeros sintéticos,<sup>30,31</sup> e *in vivo*, produciendo cambios en la matriz de microtúbulos que la estabilizan.<sup>2</sup>

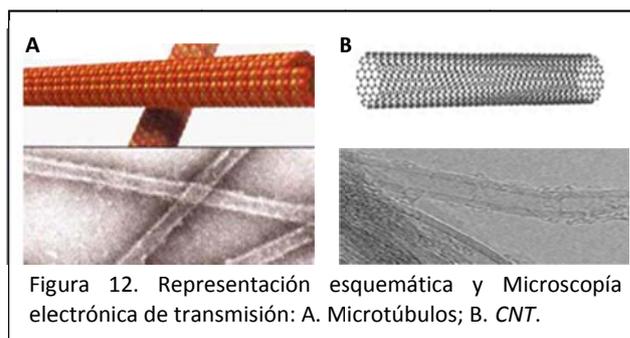


Figura 12. Representación esquemática y Microscopía electrónica de transmisión: A. Microtúbulos; B. *CNT*.

Como se expuso previamente, en el tratamiento del cáncer, los quimioterápicos disponibles más demandados son los dirigidos contra los microtúbulos, a pesar de las resistencias generadas por el

tumor. Por ello una de las líneas de investigación contemporánea que busca erradicar dichas resistencias se basa en la utilización de los *CNT* como agentes estabilizadores de microtúbulos.

La estabilización de microtúbulos a través de *CNT* tiene dos tipos de efectos en función de la fase del ciclo celular en que actúen. En la interfase, los *CNT* producen aberraciones en el centrosoma, ya que al unirse a los microtúbulos promueven el desprendimiento de su extremo (-) del centrosoma y desorganización del patrón radial del citoesqueleto de microtúbulos. Este efecto altera la capacidad de migración de las células,<sup>32,33</sup> pudiendo aplicarse como inhibidor de la propagación y metástasis. Durante la mitosis, los *CNT* provocan la catástrofe mitótica que impide la proliferación y migración celular, ya que al interferir con la dinámica de los microtúbulos del huso mitótico se altera el ensamblaje del huso permaneciendo activo el SAC; pero también se pueden producir aberraciones mitóticas y malsegregación de cromosomas.<sup>29,34,35</sup>

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, tanto los *CNT* como el resto de agentes que interfieren con la dinámica de los microtúbulos generan los mismos efectos, pero con un mecanismo de unión a los microtúbulos completamente diferente.<sup>2</sup> Los *CNT* no se unen a regiones específicas de la  $\beta$ -tubulina sino longitudinalmente a los protofilamentos estableciéndose un contacto previsiblemente más estable que con los fármacos tradicionales (Figura 9). Este tipo de interacción es difícil de modificar por mutaciones puntuales en los genes de tubulina, reduciéndose el riesgo de resistencia genética al efecto antiproliferativo y citotóxico de los *CNT*. Además de que presumiblemente, potencien el efecto citotóxico de cualquier antineoplásico retrasando la salida de mitosis y previniendo el deslizamiento mitótico.<sup>24</sup>

Pero los *CNT* no se limitan a estabilizar los microtúbulos, también actúan como estabilizadores de filamentos de actina, participando a la inhibición de la división celular y la migración. Estudios previos han demostrado la interacción de los *SWCNT* con los filamentos de actina y sus consecuencias, tales como la modificación del fenotipo celular mediante agregación y redistribución de los filamentos de actina.<sup>36</sup> Por lo que el presente trabajo pretende valorar si los *MWCNT* pueden generar este mismo efecto o incluso optimizarlo debido a dos de las principales ventajas de los *MWCNT* respecto a los *SWCNT*. En primer lugar, el efecto citotóxico de los *CNT* depende de su afinidad, en términos morfológicos de diámetro y longitud, por los diferentes elementos intracelulares,<sup>34,37,38,39</sup> siendo los *MWCNT* más selectivos ya que interactúan preferentemente con los microtúbulos y filamentos de actina,<sup>2,29,30,40</sup> mientras que los *SWCNT* pueden interactuar con el ADN de doble cadena generando efectos clastogénicos.<sup>34,35,38,41-45</sup>

En segundo lugar, las dimensiones de los *MWCNT* les convierten en una opción más compatible para interactuar con los filamentos de actina, además de presentar una mayor superficie para dicha interacción (Figura 13).<sup>2,15</sup>

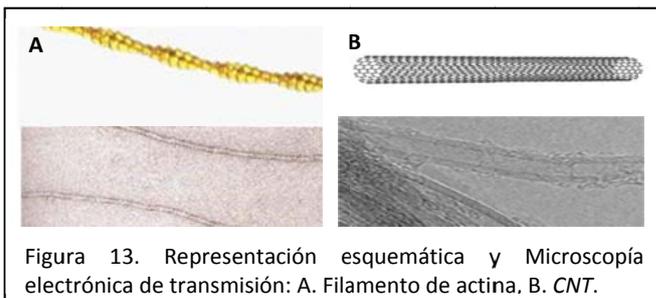


Figura 13. Representación esquemática y Microscopía electrónica de transmisión: A. Filamento de actina, B. *CNT*.

## **OBJETIVOS**

Los principales objetivos de este trabajo de fin de grado se centran en el estudio *in vitro* de forma cualitativa y descriptiva del efecto de los *MWCNT* sobre los filamentos de actina en dos líneas celulares muy diferentes entre ellas, HeLa y B16F10. Las alteraciones en los filamentos de actina contribuirán a la inhibición de la división celular y la migración, así como a la modulación fenotípica de la célula.

Las células HeLa son una línea celular de adenocarcinoma cervico-uterino humano.<sup>46</sup> Fue la primera línea de células inmortales debido a su resistencia a la apoptosis y crecimiento muy agresivo, ya que siguen proliferando siempre que dispongan de un medio adecuado. Son un modelo homogéneo, bien caracterizado y una de las principales líneas celulares empleadas en el estudio de cáncer.

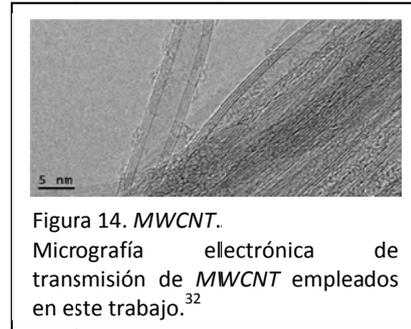
Las células B16F10 son una línea celular de melanoma murino<sup>46</sup> caracterizadas por ser muy agresivas, genéticamente muy heterogéneas y metastatizar produciendo nódulos pigmentados visibles. Son un modelo de estudio muy apropiado por su fácil reconocimiento en el *in vivo* y los resultados obtenidos podrían aportar información para su futuro empleo como terapia.

De acuerdo a sus características y su amplio conocimiento por parte del Grupo de Nanomedicina, Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, donde he realizado este estudio, se decidió trabajar con dichas líneas celulares. Además, las características diferenciales de ambas líneas celulares permitieron una valoración comparativa de la eficacia de los efectos antiproliferativo, antineoplásico y modulador fenotípico de los *MWCNT* sobre ellas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Nanotubos de carbono multipared**

Se emplearon *MWCNT* caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión en estudios previos realizados por el Grupo de Nanomedicina. Los *MWCNT* empleados presentan un número variable de paredes, entre 3 y 12, con un diámetro externo de 5-15 nm y un diámetro interno de 2.5-10 nm, y longitud variable (Figura 14).

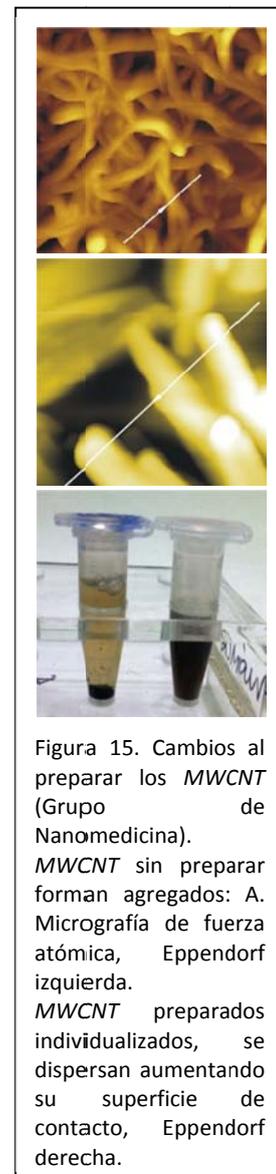


### **Preparación de Nanotubos de carbono multipared: Funcionalización y Dispersión**

La incorporación de *MWCNT* en una solución acuosa induce la formación de agregados debido a su carácter hidrofóbico, por lo que se realiza un proceso de funcionalización y dispersión con objeto de individualizar los *MWCNT* creando la mayor superficie activa posible y optimizando su rendimiento (Figura 15).<sup>27,47</sup>

Los *MWCNT* se resuspendieron en medio de cultivo tisular estándar, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía suero fetal bovino (SFB) al 30%, con el propósito de obtener una suspensión de *MWCNT* estable. Se realizaron repetidos ciclos de vortex, ciclos de dos segundos cinco veces a frecuencia de 38kHz. Seguidamente, se realizó sonicación de intensidad leve en Elmasonic SH-15 con baño de agua sonda, consiste en la aplicación de ultrasonidos generándose ondas de choque que individualizan los *MWCNT* localizados en las capas externas de los agregados, y se estabilizan mediante fuerzas de Van der Waals impidiendo su reagregación. Los *MWCNT* que forman parte de las capas internas de los agregados no llegan a dispersarse por lo que es necesario centrifugar la solución y extraer el pellet, el cual se resuspende y vuelve a someterse a sonicación.

Cuando se alcanzó la dispersión completa de los *MWCNT* se cuantificó su concentración en la solución y la estabilidad de la suspensión mediante espectrofotometría. Para ello primero se calibró el espectrofotómetro utilizando como blanco la solución formada por DMEM y SFB. Seguidamente, se midió la absorbancia óptica de la muestra a 550 nm, que junto con una recta patrón obtenida previamente permitió definir la concentración de *MWCNT* en la solución. Posteriormente se preparó la solución de trabajo mediante dilución de la solución stock de 200 µg/ml de *MWCNT* preparada en un medio de cultivo estándar.

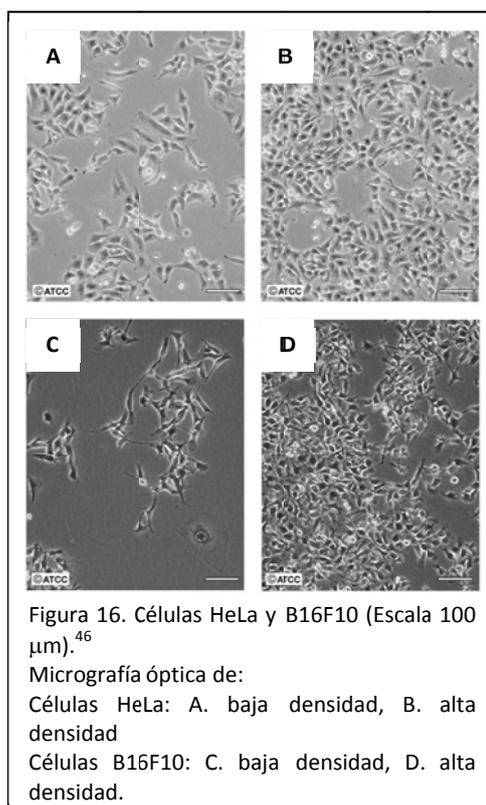


## Cultivo celular

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento y mantenimiento de células vegetales o animales *in vitro* manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las células pueden ser extraídas directamente del tejido y separadas por métodos enzimáticos y mecánicos antes de ser cultivadas o se pueden obtener a partir de una cepa o línea celular ya establecida.

**Cultivo de células HeLa.** Las células HeLa son una línea celular de adenocarcinoma cervicouterino humano con morfología epitelial, con un ciclo celular de aproximadamente 20 horas de duración (Figura 16).<sup>46</sup> Se cultivaron en medio DMEM que contenía 10% de SFB y 50µg/ml de Gentamicina, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones de 0 (control), 20 y 100 µg/ml de *MWCNT* durante 72 horas.

**Cultivo de células B16F10.** Las células B16F10 son una línea celular de melanoma de ratón con morfología de huso y tipo epitelial, cuyo ciclo celular tiene una duración aproximada de 16-18 horas (Figura 16).<sup>46</sup> Se cultivaron en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's *Medium*) que contenía 10% de SFB y 50µg/ml de Gentamicina, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones de 0 (control), 20 y 100 µg/ml de *MWCNT* durante 72 horas.



## Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica inmunohistoquímica en que se conjuga un anticuerpo con un fluorocromo, sustancia que emite un fotón cuando es excitado por un fotón incidente, exponiendo el complejo anticuerpo-fluorocromo a otro anticuerpo o a un antígeno de una muestra, con el propósito de demostrar la presencia de una determinada molécula.

Este procedimiento permite dos variantes, la inmunofluorescencia directa e indirecta. La inmunofluorescencia directa emplea un único anticuerpo unido a un fluorocromo que reconoce un antígeno específico. La inmunofluorescencia indirecta utiliza dos anticuerpos, un anticuerpo primario reconoce el antígeno diana y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo reacciona con el anticuerpo primario. En ambos casos, para determinar si la molécula diana está presente en la muestra y por tanto la reacción es positiva, se expone la muestra al microscopio de inmunofluorescencia con luz ultravioleta y al excitar el fluorocromo utilizado este emitirá fluorescencia.

Se realizó inmunotinción de los cultivos de células HeLa y B16F10 control y expuestas a 20 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de *MWCNT* previa fijación de las células en paraformaldehído al 4%. Se tiñó la actina con faloidina-isotiocianato de tetrametilrodamina B (Sigma-Aldrich®) y el ADN (núcleo y cromosomas) con colorante Hoechst (Sigma-Aldrich®).

### **Microscopía de contraste de fases y Microscopía láser confocal**

Para la visualización de los cultivos celulares se empleó microscopia de contraste de fases. En esta técnica, mediante la iluminación, se inducen sutiles variaciones en el índice de refracción dependiendo del espesor, con lo que se percibe mayor número de detalles en la estructura.

También se empleó microscopía láser confocal, que se trata de una variante de la microscopía de fluorescencia que permite obtener imágenes en foco de cualquier plano focal de la muestra fluorescente. Su principal ventaja respecto a la microscopía de fluorescencia habitual, es que proporciona una imagen más detallada y permite la reconstrucción tridimensional de una imagen de la muestra mediante la combinación de una serie de imágenes tomadas en el eje Z.

Las imágenes fueron tomadas con el equipo Nikon Ti que incluye un sistema para microscopía láser confocal Nikon A1R y microscopía de contraste de fases; y posteriormente, procesadas con el software de Investigación Avanzada Nis-Elements de las instalaciones del Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Los MWCNT penetran en las células HeLa y B16F10

En este trabajo se comprobó que los *MWCNT* penetraban en las células de los cultivos expuestos, apuntando que los cambios observados en los cultivos celulares expuestos a *MWCNT* se correlacionaban con su presencia.

En las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases se pueden observar unas estructuras a nivel intracelular en las células expuestas a *MWCNT* (Figura 17). Además, estudios previos realizados por el Grupo de Nanomedicina demuestran mediante Microscopía electrónica de transmisión y Espectroscopía Raman muestra *MWCNT* dentro de células HeLa (Figura 17).<sup>29</sup>

Debido a la nula afinidad de los *CNT* por las células, para que los *CNT* puedan atravesar la membrana plasmática de la célula deben ser preparados mediante dispersión y funcionalización, como se expone en el apartado de Materiales y Métodos. El mecanismo de entrada de los *CNT* en las células ha sido estudiado por diversos grupos de investigación, pero es difícil definir el mecanismo exacto ya que depende de su tamaño, longitud y de la correcta funcionalización previa.<sup>48,49</sup>

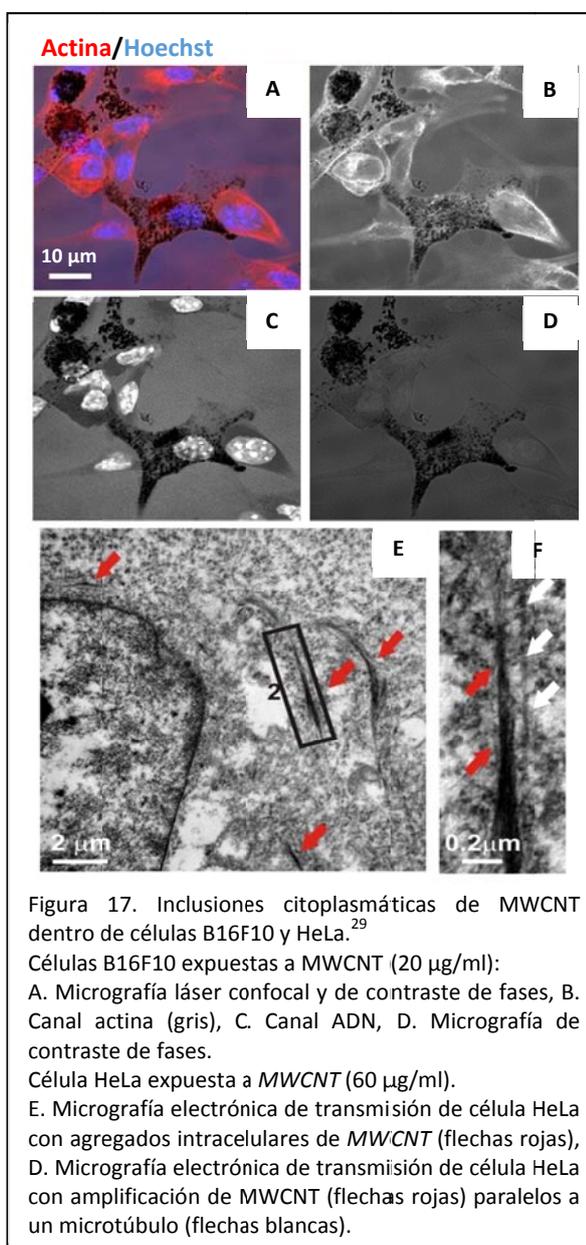


Figura 17. Inclusiones citoplasmáticas de *MWCNT* dentro de células B16F10 y HeLa.<sup>29</sup>

Células B16F10 expuestas a *MWCNT* (20 µg/ml):  
A. Micrografía láser confocal y de contraste de fases, B. Canal actina (gris), C. Canal ADN, D. Micrografía de contraste de fases.

Célula HeLa expuesta a *MWCNT* (60 µg/ml).  
E. Micrografía electrónica de transmisión de célula HeLa con agregados intracelulares de *MWCNT* (flechas rojas), D. Micrografía electrónica de transmisión de célula HeLa con amplificación de *MWCNT* (flechas rojas) paralelos a un microtúbulo (flechas blancas).

Se han propuesto dos posibles vías por las que los *CNT* atraviesan la membrana celular. Una primera vía es endocitosis-dependiente, que puede ser o no mediada por receptor, en esta vía se ha observado que los *CNT* de mayor longitud son introducidos mediante fagocitosis mientras que los de menor longitud son internalizados por pinocitosis.<sup>50</sup>

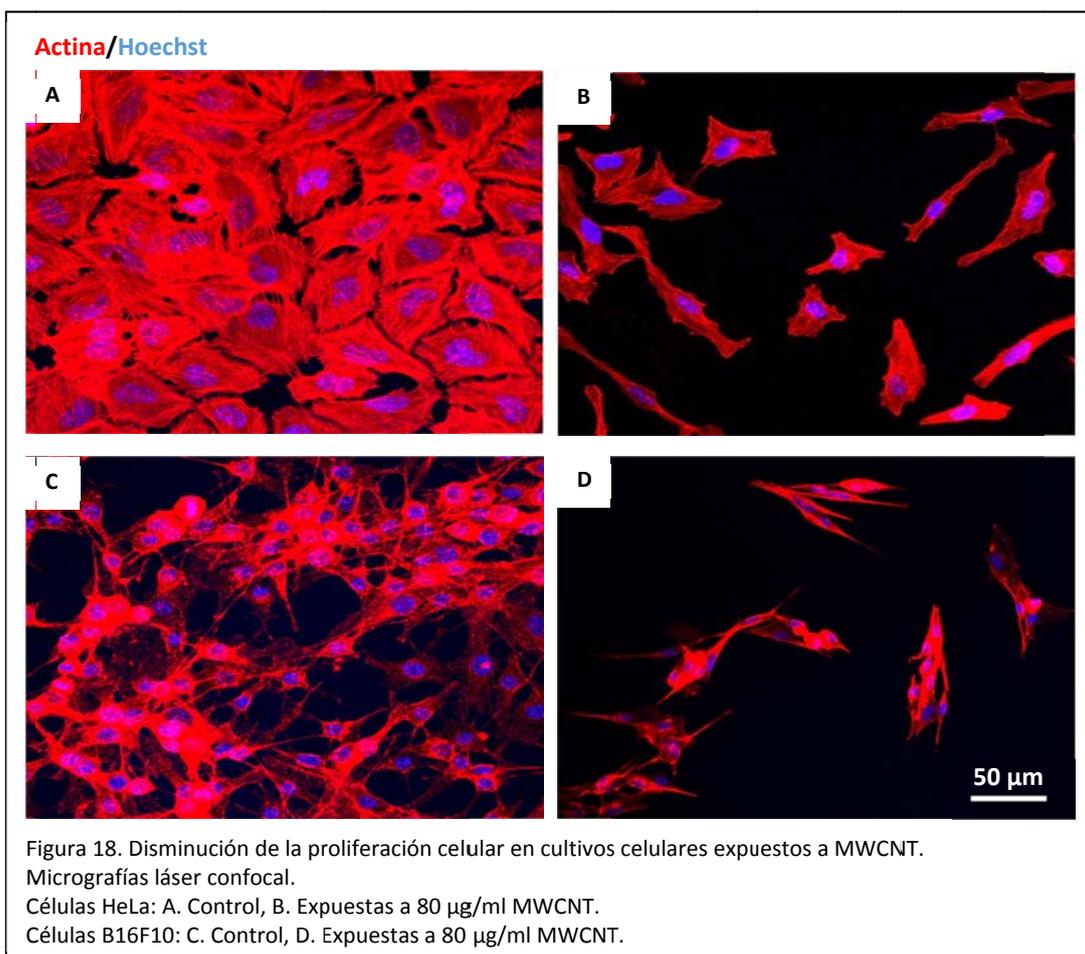
Una segunda vía es endocitosis-independiente, la cual incluye los mecanismos de difusión, fusión de membranas o transporte directo a través de poros.<sup>48</sup>

### Los *MWCNT* reducen la proliferación de las células HeLa y B16F10

Se incubaron células HeLa y B16F10 durante 72 horas con *MWCNT* a concentraciones crecientes de 0 (control) 20 y 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dichas concentraciones fueron seleccionadas basándose en estudios previos, en los que se mostraba una correcta internalización de los *MWCNT* y un efecto citotóxico moderado.<sup>29</sup>

Se confirmó mediante microscopia de contraste de fases la viabilidad celular descartando un efecto citotóxico agudo por parte de los *MWCNT*.

Al comparar los cultivos celulares control con los expuestos a *MWCNT* se observó una menor densidad celular en estos últimos sugiriendo la interferencia de los *MWCNT* con la dinámica del citoesqueleto en el ciclo celular (Figura 18).



Estos cambios cualitativos ya han sido observados en trabajos previos con cultivos de células HeLa expuestas a *MWCNT*. En ellos se indica una interferencia de los *MWCNT* con los microtúbulos del huso mitótico que conduce a una disminución en la proliferación celular por retraso o bloqueo de la división y consecuente muerte celular por apoptosis.<sup>29</sup> Igualmente, investigaciones previas con cultivos de células HeLa expuestas a *SWCNT* identificaron una reducción en la proliferación celular explicada por la interacción entre los *SWCNT* y los filamentos de actina. En ellos se propone que

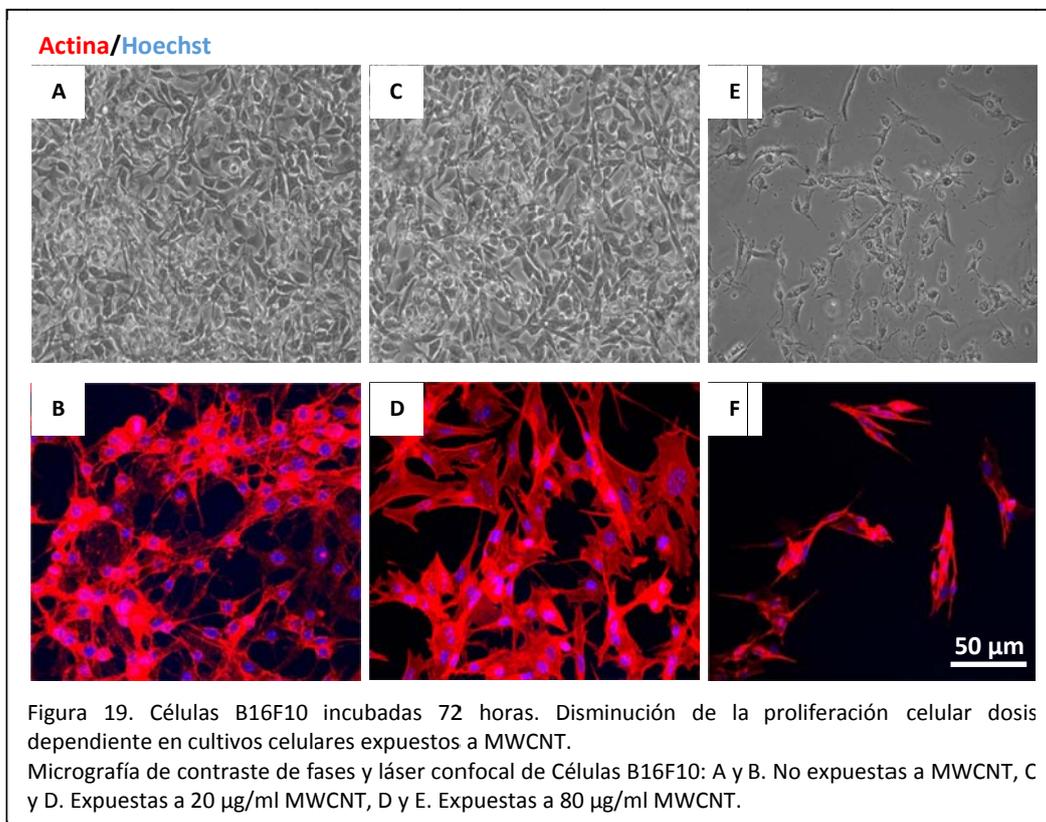
los *SWCNT* actúan estabilizando los filamentos de actina, que intervienen en la formación del anillo contráctil de la citocinesis, de forma que dichos filamentos no pueden desensamblarse y las células quedan bloqueadas en una fase tardía de la citocinesis.<sup>36,37,51</sup>

Consecuentemente, los resultados antiproliferativos y antineoplásicos obtenidos en este trabajo pueden deberse a ambas causas, la interferencia de los *MWCNT* con los microtúbulos de huso mitóticos y los filamentos de actina del anillo contráctil, ya que se obtienen resultados uniformes a trabajos previos.

Sin embargo, en estudios anteriores no se valoró el efecto de los *CNT* sobre la línea celular B16F10. De acuerdo con este trabajo, en el que no se encontraron grandes diferencias al comparar la densidad celular en cultivos HeLa y B16F10 expuestas a la misma concentración de *MWCNT*, se puede concluir que el efecto antiproliferativo y antineoplásico de los *MWCNT*<sup>29</sup> también se ejerce sobre las células B16F10 independientemente de la agresividad de la línea celular (Figura 18).

- La disminución en la proliferación celular de HeLa y B16F10 es dosis dependiente

Al contrastar los cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de *MWCNT* se estableció una relación inversamente proporcional entre la concentración de *MWCNT* y la densidad celular (Figura 19), ya observada en estudios previos con cultivos de células HeLa expuestas a *SWCNT*<sup>36</sup> y *MWCNT*<sup>29</sup>. Por lo que se puede afirmar que a mayor concentración de *MWCNT* a la que se exponga el cultivo celular resultará en una menor proliferación celular y por ende una menor densidad celular.



## Los *MWCNT* interfieren en la dinámica de los filamentos de actina provocando cambios en las células HeLa y B16F10

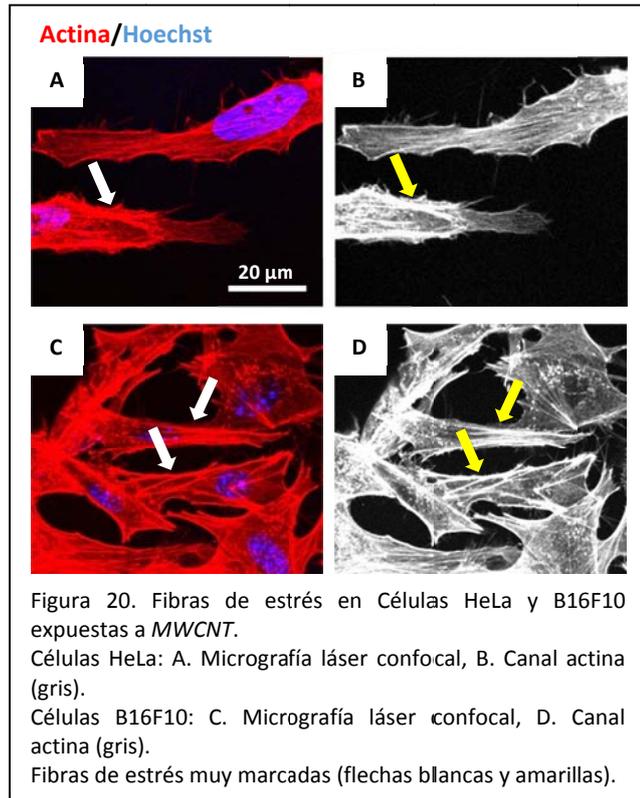
La interacción entre los *MWCNT* y los filamentos de actina se estudió mediante tinción de las células con colorante Hoescht (canal azul) para marcar el ADN y faloidina rodaminada (canal rojo) para marcar la actina, y visualización posterior al microscopio de contraste de fases y láser confocal.

- Redistribución de los filamentos de actina

Al comparar las imágenes de microscopía láser confocal de los cultivos celulares control y los expuestos a *MWCNT* se identificó un cambio significativo en la distribución de los filamentos de actina. En ambas líneas celulares se observó una marcada presencia de actina en todo el córtex celular con elongaciones de los filamentos de actina y pequeñas protusiones de escasos micrómetros que se extendían desde el borde celular.

- Aumento del número de fibras de estrés

Se detectó un aumento en el número de fibras de estrés en los cultivos de células expuestas a *MWCNT* (Figura 20).

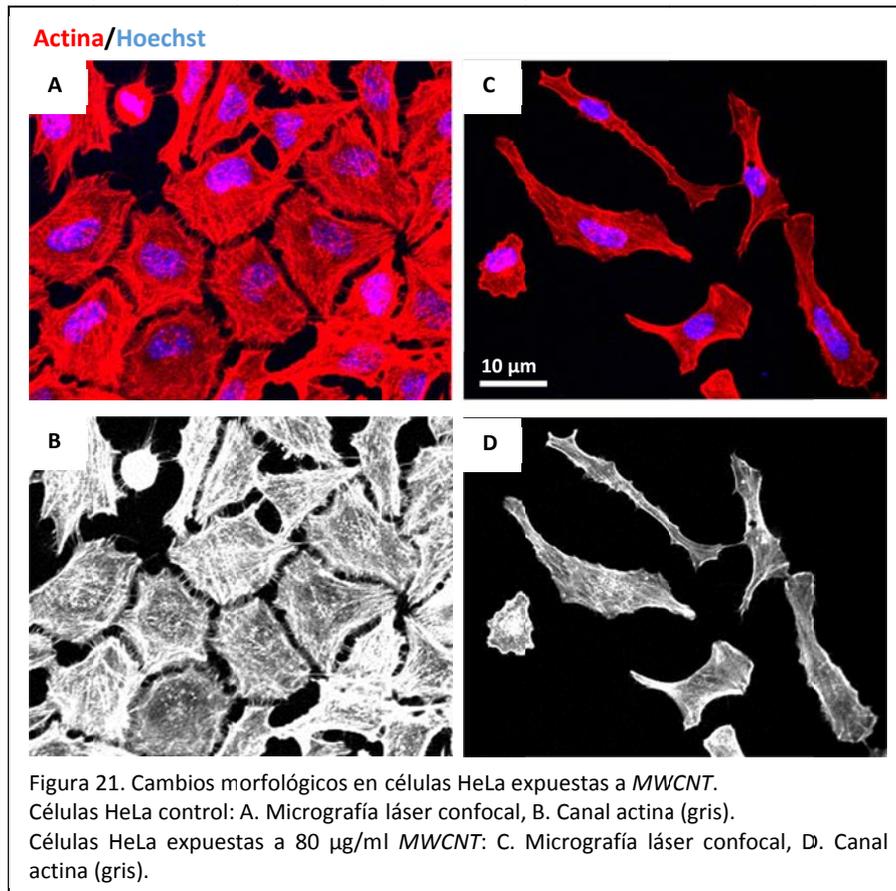


Semejantes alteraciones fueron observadas al estudiar el efecto de los *SWCNT* sobre células HeLa, en los que se sugirió que la reorganización de los filamentos de actina fue inducida por los *SWCNT* y la formación de fibras de estrés por atracción de la actina a la superficie celular por los *SWCNT*.<sup>36</sup>

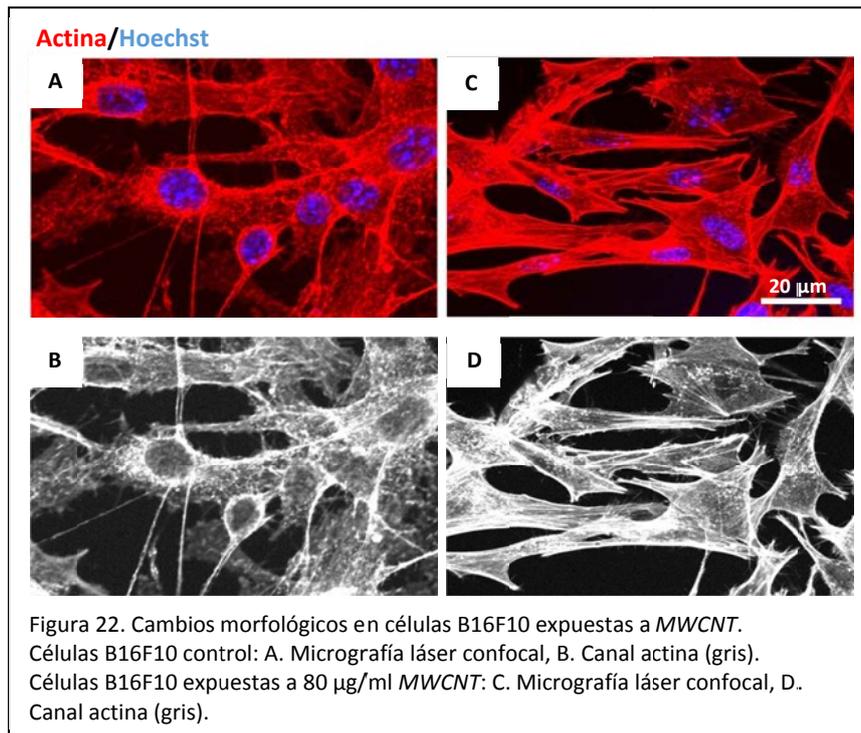
- Cambios en la morfología celular

Se confrontaron los cultivos celulares control con los expuestos a *MWCNT* objetivándose cambios significativos en la morfología de las células expuestas a *MWCNT* de ambas líneas celulares. Debido al papel fundamental de la actina en el soporte y configuración celular, se sugiere que la reorganización de los filamentos de actina por interacción con los *MWCNT* es responsable de los importantes cambios en la forma celular.

Las células HeLa control presentaron una morfología epitelial característica de esta línea celular, de contorno pentagonal, bordes bien definidos y una disposición en monocapa con múltiples adhesiones entre ellas. Mientras que las células tratadas con *MWCNT* tenían una distribución dispersa debido a la disminución proliferativa, y disponían de un aspecto más alargado con dos o más prolongaciones citoplasmáticas de hasta 30  $\mu\text{m}$  de longitud proyectadas en direcciones aleatorias (Figura 21). Su aspecto recordaba más a la estructura de células de sostén del sistema nervioso periférico, células de Schwann, que presentan un aspecto bi o multipolar, y cuya especialización morfológica depende del citoesqueleto.<sup>7</sup>



Las células B16F10 control, de acuerdo al aspecto habitual de esta línea celular, mostraron una forma epitelial y fusiforme con típicas elongaciones de escaso espesor. Sin embargo, las células expuestas a *MWCNT* habían perdido la forma redondeada del cuerpo celular y desarrollado un citoplasma más engrosado del que partían múltiples elongaciones citoplasmáticas de menor longitud y mayor espesor que en las células control, pero análogas en dimensiones a las presentadas por las células HeLa (Figura 22).

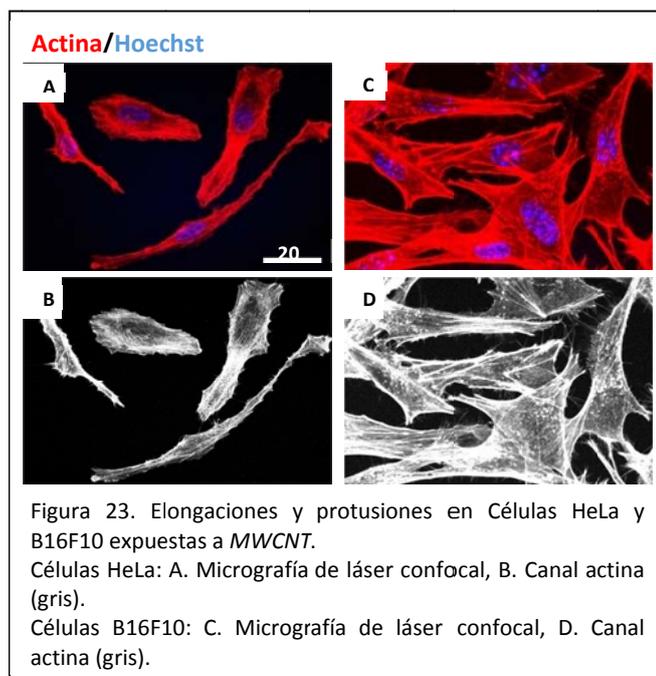


Asimismo, como se propone en estudios previos con células HeLa, la presencia de *MWCNT* no endocitados presentes en el medio de cultivo puede haber contribuido a desarrollar las elongaciones observadas en las células expuestas de ambas líneas celulares.<sup>29</sup> En consecuencia, los *MWCNT* ejercerían un efecto en la morfología celular por actuación intra y extracelular.

Con los resultados presentados, se puede concluir que los *MWCNT* ejercen un efecto modulador del fenotipo celular en ambas líneas celulares al interferir con los filamentos de actina y ocasionar la redistribución de los mismos, que confiere a las células un aspecto más diferenciado.

Aunque las variaciones morfológicas observadas en ambas líneas celulares respecto a sus controles no son superponibles presentaron algunos cambios comunes tales como elongaciones citoplasmáticas dirigidas por las

prolongaciones de los filamentos de actina, pequeñas protusiones de los filamentos de actina y aumento del número de fibras de estrés (Figura 23). Este hecho orienta hacia



una interacción similar entre filamentos de actina y *MWCNT* en ambos tipos celulares que condiciona una redistribución de los filamentos de actina y cambios en la morfología celular afines.

En el tratamiento de las células tumorales con *MWCNT*, estas pueden responder de dos formas; quedando bloqueadas en metafase y sufriendo muerte celular por apoptosis o retornando a la fase G0 del ciclo celular para diferenciarse, proceso en el cual la célula deja de dividirse y sufre modificaciones morfológicas y funcionales para desempeñar una función especializada.<sup>2</sup> Este tipo de respuesta podría suponer una ventaja terapéutica ya que al limitar su división celular estabilizaría el crecimiento de la masa tumoral. En este trabajo se observaron ambas respuestas por parte de los cultivos celulares expuestos a *MWCNT*. Como se ha explicado previamente se identificó una disminución en la densidad celular en relación con la muerte celular por apoptosis; y cambios morfológicos que sugieren una tendencia hacia la diferenciación celular.

### Cambios en el ciclo celular

Entre los recientes estudios llevados a cabo por el Grupo de Nanomedicina, se incluyen los cambios en el ciclo celular generados por la interacción de los *MWCNT* con el huso mitótico.

Con el propósito de identificar dichos cambios se han realizado las siguientes aproximaciones.

- Determinación del tiempo de división mediante microscopio de célula viva (*Time-lapse*)

A partir del cultivo de células B16F10 no expuestas a *MWCNT*, cultivo control, y expuestas a 60  $\mu\text{g/ml}$  de *MWCNT* durante 48 horas, se estimó la duración de la división celular. Para este fin, se dispusieron las placas de cultivo en el microscopio de célula viva Nikon Ti del Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL y se tomaron fotografías a intervalos de 15 minutos. Posteriormente, tomando una muestra de 270 células, se analizó célula a célula el número de fotografías que era necesario realizar para recoger en imágenes la división celular completa de cada célula. Basándose en que cada fotografía se realizó con un intervalo de 15 minutos se determinó que la duración media de la división celular era 48.2 minutos en las células del cultivo control y 59.7 minutos en las células del cultivo expuesto.

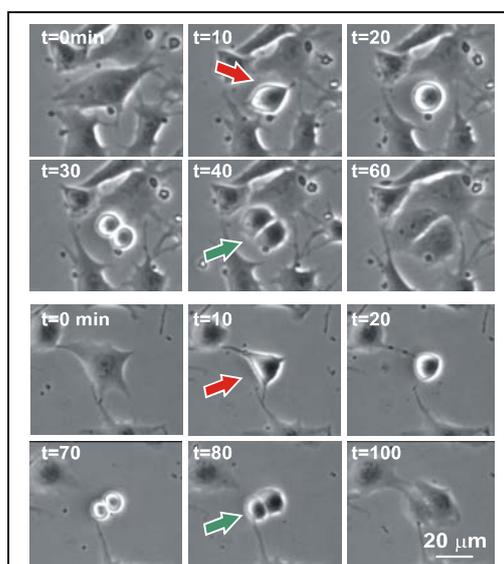


Figura 24. Imágenes de Microscopía de célula viva tomadas a intervalos de tiempo predeterminado. A. Cultivo de células B16F10 control; B. Cultivo de células B16F10 tratadas con *MWCNT*. Se contabiliza el tiempo transcurrido desde el inicio de la división celular (flecha roja) hasta el final de la división celular (flecha verde). Las células tratadas con *MWCNT* presentan un enlentecimiento de la división celular.

Estos resultados muestran un enlentecimiento del 20% en la división de las células expuestas a *MWCNT*; apoyando las conclusiones recogidas previamente de que los *MWCNT* interfieren con los microtúbulos del huso mitótico induciendo un retraso en la división celular.

- Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite identificar las diferentes etapas del ciclo celular en que se encuentran las células mediante cuantificación del ADN celular.

Para este estudio, se tiñeron con colorante Hoescht cultivos de células B16F10 no expuestas, cultivo control, y expuestas a *MWCNT* durante 48 y 70 horas. Posteriormente se sometieron al citómetro de flujo midiéndose la intensidad de fluorescencia de las células de forma individual.

Los resultados obtenidos se representan gráficamente mediante un histograma, que describe el porcentaje de células con una intensidad de fluorescencia determinada, la cual es proporcional a la cantidad de ADN celular. En el histograma se identifican principalmente las fases de crecimiento celular ( $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$ ), que constituyen la interfase. En condiciones de normalidad, se reconocen dos picos que corresponden a la fase  $G_1$ , en la cual la célula está creciendo sin replicar su

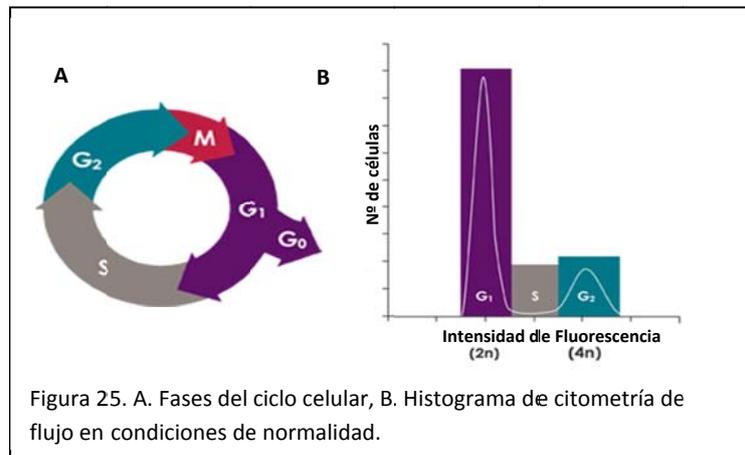


Figura 25. A. Fases del ciclo celular, B. Histograma de citometría de flujo en condiciones de normalidad.

$G_2$ ), que constituyen la interfase. En condiciones de normalidad, se reconocen dos picos que corresponden a la fase  $G_1$ , en la cual la célula está creciendo sin replicar su ADN por lo que presenta dos copias ( $2n$ ), y a la fase  $G_2$  que presenta el doble de ADN ( $4n$ ) ya que es precedida por la fase  $S$  de síntesis de ADN en la que las células tienen una cantidad entre  $2n$  y  $4n$ . Tras la fase  $G_2$  el ciclo celular se completa con la fase  $M$  de mitosis seguida de la citocinesis (Figura 25). Además, aquellas células que hayan sufrido apoptosis mostrarán una cantidad de ADN inferior a  $2n$ .

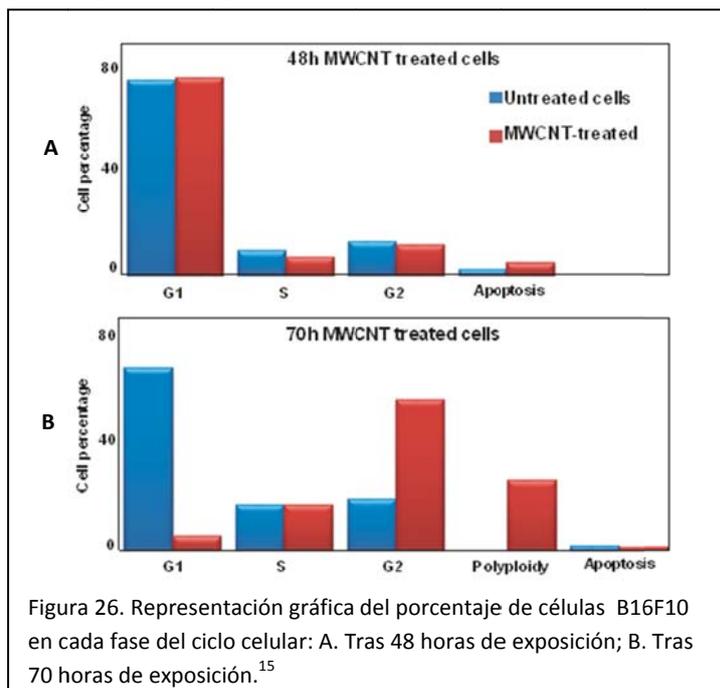


Figura 26. Representación gráfica del porcentaje de células B16F10 en cada fase del ciclo celular: A. Tras 48 horas de exposición; B. Tras 70 horas de exposición.<sup>15</sup>

Comparando los resultados obtenidos en el cultivo control y en el expuesto a *MWCNT* se observaron pequeñas diferencias tras las primeras 48 horas de exposición, siendo lo más significativo el mayor porcentaje de células apoptóticas en el cultivo de células expuestas a *MWCNT*. Sin embargo, tras 70 horas de exposición se identificó una intensa disminución del porcentaje de células en fase G1 contrarrestado por el aumento en fase G2. Además, existe un porcentaje elevado de células con anomalías cromosómicas. Estos datos muestran un estancamiento de las células B16F10 expuestas a *MWCNT* en fase G2/M, confirmando un bloqueo en la división celular por interferencia de los *MWCNT* con los microtúbulos del huso mitótico (Figura 26).

### **PRÓXIMOS ESTUDIOS**

Con el propósito de estudiar de forma más directa la interacción de los *MWCNT* con los filamentos de actina, conocer más exhaustivamente su mecanismo de interferencia e interpretar más profundamente los cambios celulares observados en el presente trabajo, se proponen los siguientes estudios. La realización de ensayos con filamentos de actina *ex vivo* que permitirían excluir el sesgo de confusión ocasionado por los múltiples factores a nivel intracelular. Complementado con estudios a nivel molecular para la identificación de los sitios de interacción entre los filamentos de actina y los *MWCNT*, así como las características necesarias para lograr uniones más estables y mayor superficie de interacción entre ambos elementos.

### **POSIBLES APLICACIONES**

Son múltiples las aplicaciones que se les están confiriendo a los *MWCNT*, pero de acuerdo al área de investigación a la que hace referencia este trabajo podemos destacar las siguientes.

La actuación de los *MWCNT* como estabilizadores de elementos del citoesqueleto los convierte en un potencial antineoplásico, presentando como principal ventaja un mecanismo de acción divergente al de otros antineoplásicos estabilizadores del citoesqueleto. Por lo tanto, podrían utilizarse como terapia adyuvante o neoadyuvante de los quimioterápicos tradicionales dirigidos contra los microtúbulos ejerciendo un efecto aditivo de inhibición de la división celular, potenciando el efecto citotóxico de los quimioterápicos tradicionales y evadiendo las resistencias tumorales generadas contra ellos.<sup>2</sup> Igualmente, podría sustituir a los antineoplásicos dirigidos contra los filamentos de actina que por su elevada toxicidad no han superado la etapa preclínica de desarrollo.

Además, como también apuntan estudios previos, los *CNT* podrían emplearse como elemento modulador del fenotipo celular, dada su capacidad para producir cambios morfológicos en las células por interferencia con los filamentos de actina.<sup>51</sup>

## **OBJETIVOS FUTUROS**

El principal obstáculo para que los *CNT* lleguen a someterse a ensayo clínico para su posterior uso biomédico es su eficacia y toxicidad, ya que debe conseguirse un efecto tóxico focalizado en las células tumorales. Se ha documentado la producción de efectos secundarios no deseados en células y tejidos no diana<sup>52,53</sup> tales como reacciones inflamatorias, citotóxicas y genotóxicas, rotura del ADN, aneuploidía y cáncer.<sup>29,34,35</sup>

A pesar de su toxicidad, no deben ser desechados como posibles antineoplásicos ya que muchas de las terapias actuales se basan en el desarrollo de un efecto tóxico controlado. Por lo tanto, es necesario seguir investigando para comprender con exactitud su farmacocinética y toxicidad *in vivo*.<sup>15</sup>

## **OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS CNT**

Son varias las propiedades fisicoquímicas de los *CNT* que juegan un papel importante en su farmacocinética. Afortunadamente, algunas son modificables por lo que están siendo analizadas para mejorar el perfil cinético de los *CNT*.

### **Preparación de los CNT**

La preparación de los *CNT* mediante funcionalización y dispersión es un elemento fundamental para estabilizarlos en el medio acuoso, asegurar una adecuada captación celular, aumentar la superficie de contacto para la interacción y mitigar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.<sup>54</sup>

La funcionalización química es determinante en la biodistribución de los *CNT*, ya que se ha comprobado que una funcionalización covalente puede conducir una significativa y rápida excreción urinaria, mientras que una funcionalización no covalente deriva en su acumulación, preferentemente en hígado y bazo.<sup>54</sup>

### **Dimensiones de los CNT**

La optimización de las dimensiones de los *CNT* tiene como fin principal mejorar su biocompatibilidad para evitar su acúmulo crónico y tóxico en los tejidos y posibilitar ciclos de tratamiento con *CNT*.

Mediante la reducción de la longitud de los *CNT* se han observado dos consecuencias. Una de ellas es que facilita la degradación celular de los *CNT* tras su actuación. El tumor sólido consta de dos elementos, las células tumorales y el estroma que contiene células del sistema inmune; como macrófagos, encargados de fagocitar elementos extraños presentes en el medio, en este caso los *CNT*.<sup>55</sup> Se ha observado que los macrófagos son incapaces de fagocitar *MWCNT* de gran longitud generándose una mayor respuesta inmune que en el caso de ser fagocitados por poseer menor longitud.<sup>56</sup> La otra consecuencia es que se facilita su eliminación por los órganos excretores, ya que se ha demostrado que una correcta dispersión y menor longitud de los *CNT* permite una excreción renal más rápida y con menor riesgo de nefrotoxicidad.<sup>54</sup>

## **OPTIMIZACIÓN DE LA ACTUACIÓN DE LOS CNT SOBRE LAS CÉLULAS TUMORALES**

Hasta el momento solo es posible la aplicación de *CNT* como tratamiento local ya que para su aplicación sistémica se requiere un mecanismo que dirija los *CNT* al tejido diana sin causar efectos adversos en el resto de los tejidos. En este aspecto, algunas de las estrategias que están teniendo buenos resultados *in vitro* y con modelos animales son las siguientes.

### **Marcaje de *CNT* con anticuerpos monoclonales**

Esta técnica permite la administración sanguínea de *CNT* y actuación específica sobre las células tumorales mediante un sistema de dos fases, que se basa en la llamada Nanotecnología Inteligente. En una primera fase, un agente dirigido específicamente contra el tumor, el anticuerpo monoclonal, se administra por vía sistémica y permanece en circulación sanguínea suficiente tiempo para acumularse en el tumor y eliminarse de la sangre. En una segunda fase, se administra por la misma vía un agente con efecto citotóxico y de rápida eliminación de la sangre, los *CNT*, que presentan alta afinidad por los anticuerpos monoclonales formando un complejo que posteriormente se internaliza en la célula. Para llevar a cabo la unión *CNT* - Anticuerpo monoclonal ambos agentes son previamente modificados mediante la incorporación de secuencias de oligonucleótidos complementarias.<sup>57</sup>

### **Captación de *CNT* por monocitos específicos**

Esta estrategia, de mecanismo aún desconocido, consiste en la administración sistémica de *CNT* que son reconocidos e internalizados por monocitos específicos circulantes de la sangre, que conducen y ceden los *CNT* al tumor. Además, la capacidad de captación de *CNT* por los monocitos se incrementa mediante la unión de un ligando a los *CNT*.<sup>58</sup>

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de este trabajo demuestran que los *MWCNT* penetran en células HeLa y B16F10 manteniéndose la viabilidad celular y descartando un efecto citotóxico agudo por parte de los *MWCNT*.

Los cultivos de células HeLa y B16F10 expuestos a *MWCNT* presentan una disminución en la proliferación celular dosis dependiente.

Los *MWCNT* interfieren con la dinámica de los filamentos de actina provocando su redistribución y un aumento de la presencia de fibras de estrés. La interacción entre los *MWCNT* y los filamentos de actina provoca cambios en la morfología celular presentando un aspecto más diferenciado en comparación con las células de los cultivos control.

En este trabajo se han identificado los dos tipos de respuesta de las células tumorales frente a los *MWCNT*, muerte celular por apoptosis y diferenciación celular.

Los resultados obtenidos se han observado de forma paralela en ambas líneas celulares, confirmando el efecto antiproliferativo, antineoplásico y modulador fenotípico en HeLa y evidenciando el mismo efecto en B16F10.

Estudios recientes realizados por el Grupo de Nanomedicina confirman la interferencia de los *MWCNT* con el huso mitótico en células B16F10, debido al retraso o bloqueo en fase G2/M del ciclo celular de los cultivos expuestos a *MWCNT*.

Aunque todavía son necesarios nuevos estudios para completar el conocimiento sobre múltiples aspectos de la actuación de los *CNT* como terapia antineoplásica, los resultados obtenidos hasta el momento señalan a los *CNT* como un gran candidato para su empleo futuro.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Cooper GM, Hausman RE. Capítulo 11. Citoesqueleto y movimiento celular. La Célula. 3ª ed. Madrid: Marbán; 2006: 435-482.
- [2] García Hevia L, Fernández F, Grávalos C, García A, Villegas JC, Fanarraga ML. Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine. *Nanomedicine* 2014; 9: 1581-1588.
- [3] Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv.* 2011; 11: 41-150.
- [4] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 253-265.
- [5] Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 2005; 5: 65-71.
- [6] Jordan M. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem.* 2012; 2(1): 1-17.
- [7] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Parte IV Organización interna de la célula; Capítulo 16. El citoesqueleto. *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Barcelona: Omega; 2010: 965-1052.
- [8] Chretien D, Fuller SD, Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: two dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 1311-1328.
- [9] Mitchison TJ. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 1993; 261: 1044-1047
- [10] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312: 237-242.
- [11] Tassin A, Bornens M. Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol. Cell* 1999; 91: 343-354.
- [12] Cassimeris L, Pryer NK, Salmon ED. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 2223-2231.
- [13] Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997; 13: 83-117.
- [14] Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998; 12 (1): 123-130.
- [15] García Hevia L, Valiente R, González J, Fernández-Luna JL, Villegas JC, Fanarraga ML. Anti-cancer cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21: 1-10.

- [16] Bousquet PF, Paulsen LA, Fondy C, Lipski KM, Loucy KJ, Fondy TP. Effects of cytochalasin B in culture and *in vivo* on murine Madison 109 lung carcinoma and on B16 melanoma. *Cancer Res.* 1990; 50: 1431-9.
- [17] Senderowicz AM, Kaur G, Sainz E, *et al.* Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 46-51.
- [18] Bonello TT, Stehn JR, Gunning PW. New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy. *Future Med. Chem.* 2009; 1: 1311-31.
- [19] Chen J, Liu T, Dong X, Hu Y. Recent development and SAR analysis of colchicine binding site inhibitors. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2009; 9: 1174-1190.
- [20] De Brabander M, Geuens G, Nuydens T, Willebrords R, De Mey J. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 78: 5608-5612.
- [21] Alberti C. Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma. *Eur. Rec. Med. Pharmacol. Sci.* 2013; 17: 1658-1664.
- [22] Kowalski RJ, Giannakakou P, Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxols). *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2534-2541.
- [23] Orr GA, Verdier-Pinard P, Mc Daid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene.* 2003; 22: 7280-7295.
- [24] Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell.* 2009; 16: 347-358.
- [25] Lechuga LM. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. 9ª Ed. Curso de Biotecnología aplicada a la salud humana.
- [26] Ma P-C, Siddiqui NA, Marom G, Kim J-K. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Composites Part A: applied science and manufacturing.* 2010; 41: 1345-1367.
- [27] Rastogi V, Yadav P, Sankar Bhattacharya S, Kumar Mishra A, Verma N, Verma A, Kumar Pandit J. Carbon nanotubes: An emerging drug carrier for targeting cancer cells. *Journal of Drug Delivery.* 2014: 1-23.
- [28] Pampaloni F, Florin EL. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 302-310.
- [29] Rodríguez-Fernández L, Valiente R, González J, Villegas JC, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties *in vivo*, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano.* 2012; 6: 6614-6625.

- [30] Dinu CZ, Bale SS, Zhu G, Dordick JS. Tubulin encapsulation of CNTs into functional hybrid assemblies. *Small*. 2009; 5: 310-315.
- [31] Dinu CZ, Bale SS, Dordick JS. Kinesin I. ATPase manipulates biohybrids formed from tubulin and carbon nanotubes. *Methods Mol. Biol.* 2011; 743: 77-93.
- [32] Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv. Healthc. Mater.* 2014; 3: 424-432.
- [33] Dong C, Kashon ML, Lowry D et al. Exposure to carbon nanotubes leads to changes in the cellular biomechanics. *Adv. Healthc. Mater.* 2013; 2: 945-951.
- [34] Sargent LM, Hubbs AF, Young SH et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res.* 2012; 745: 28-37.
- [35] Gonzalez L, Decordier I, Kirsch-Volders M. Induction of chromosome malsegregation by nanomaterials. *Biochem. Soc. Trans.* 2010; 38: 1691-1697.
- [36] Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang Y, Islam MF, Dahl KN. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and *ex vivo*. *ACS Nano*. 2010; 4(8): 4872-4878.
- [37] Shams H, Holt BD, Mahboobi SH et al. Actin reorganization through dynamic interactions with single wall carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2013; 8: 188-197.
- [38] Li X, Peng Y, Ren J, Qu X. Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 19658-19663.
- [39] Lindberg HK, Falck GC, Singh R et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. *Toxicology*. 2013; 313: 24-37.
- [40] Ju L, Zhang G, Zhang X, et al. Proteomic analysis of cellular response induced by multiwalled carbon nanotubes exposure in A549 cells. *PLoS One*. 2014; 9: e84974.
- [41] Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology*. 2010; 21: 015102.
- [42] Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S, Poma A. Effects of single and multiwalled CNTs on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat. Res.* 2011; 722: 20-31.
- [43] Sargent LM, Shvedova AA, Hubbs AF, et al. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009; 50: 708-717.

- [44] Kisin ER, Murray AR, Sargent L, et al. Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than CNTs or asbestos? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011; 252: 1-10.
- [45] Li X, Peng Y, Qu X. Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B-A transition in solution. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: 3670-3676.
- [46] ATTC. Centro de recursos biológicos sin ánimo de lucro y organización de investigación.
- [47] Piret JP, Detriche S, Vigneron R, Vankoningsloo S, Rolin S, Mejia Mendoza JH, Masereel B, Lucas S, Delhalle J, Luizi F et al. Dispersion of multi-walled CNTs in biocompatible dispersants. *J. Nanopart. Res.* 2010; 12: 75-82.
- [48] Fisher C, Rider AE, Han ZJ, Kumar S, Levchenko I, Ostrikov K. Applications and nanotoxicity of carbon nanotubes and graphene in biomedicine. *Journal of Nanomaterials.* 2012; 2012: Artículo ID 315185, 19 páginas.
- [49] Kostarelos K, Bianco A, Lacerda L et al. Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials.* 2012; 33 (11): 3334-3343.
- [50] Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of nanomaterials. *Small.* 2011; 7 (10): 1322-1337.
- [51] Holt BD, Shams H, Horst TA, Basu S, Rape AD, Wang Y, Rhode GK, Mofrad MRK, Islam MF, Dahl KN. Altered cell mechanisms from the inside: dispersed single wall carbon nanotubes integrate with and restructure actin. *J. Funct. Biomater.* 2012; 3: 398-417.
- [52] Wang J, Xu Y, Yang Z et al. Toxicity of carbon nanotubes. *Curr. Drug. Metab.* 2013; 14: 891-899.
- [53] Lanone S, Andujar P, Kermanizadeh A, Boczkowski J. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65: 2063- 2069.
- [54] Ali-Boucetta H, Kostarelos K. Pharmacology of carbon nanotubes: toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013; 65: 2111-2119.
- [55] Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell.* 2010; 18 (6); 884-901.
- [56] Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Mol. Biosyst.* 2005; 1(2): 176-182.

[57] Mulvey JJ, Villa CH, McDevitt MR, Escorcia FE, Casey E, Scheinberg DA. Self-assembly of carbon nanotubes and antibodies on tumours for targeted, amplified delivery. *Nat. Nanotechnol.* 2013; 8 (10): 763-771.

[58] Smith BR, Ghosn EEB, Rallapalli H, Prescher JA, Larson T, Herzenberg LA, Gambhir SS. Selective uptake of single walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nat. Nanotechnol.* 2014; 9 (6): 481-487.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis tutoras, Mónica y Lorena, por estar disponibles siempre que lo he necesitado pero sobre todo por participar en mi formación tanto académica como personal.

Gracias a las Instalaciones del Grupo de Nanomedicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y del Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL, por permitirme emplear sus recursos para la realización de este trabajo de fin de grado.

Muy especialmente gracias, a pesar de que las palabras se quedan cortas para agradecer a mi familia, principalmente a mis padres y hermana, por acompañarme en este largo camino enseñándome a convertir las curvas que se presentan en rectas.

Gracias a cualquiera persona que en algún momento, de una forma u otra, me haya recordado que esta forma de vida merece la pena, que pequeños gestos pueden hacerte cambiar la forma de ver las cosas.