



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGIA
MANUEL VELASCO SUAREZ**

**CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR NANOTUBOS DE CARBONO
MULTICAPA EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA *IN
VITRO* E *IN VIVO***

TESIS

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA
EN NEUROCIRUGÍA**

PRESENTA

Dr. Samuel Romano Feinholz

TUTOR DE TESIS

Dr. Alberto González Aguilar



Ciudad de México, Julio 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

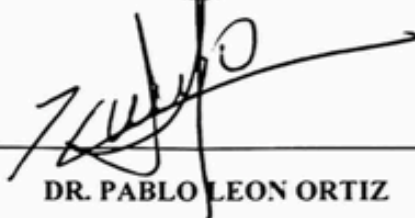


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DR. PABLO LEON ORTIZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROCIRUGÍA



DR. ALBERTO GONZÁLEZ AGUILAR
TUTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A mi familia:

A mis papás, Jaime Romano y Dafna Feinholz, quienes han sido siempre un ejemplo a seguir, siempre exitosos y siempre guiándome con buenos consejos y valores sin los cuáles nunca hubiera alcanzado este momento. Cada logro que consigo es gracias a sus enseñanzas y apoyo y por lo tanto es también de ustedes.

A mi hermano, Arie Romano, sin el cuál la familia nunca hubiera estado completa. Por todos los momentos de apoyo en este complejo camino que ha sido la vida personal y profesional y que sin embargo hemos encontrado siempre la manera de seguir adelante.

A Katia Picazo mi compañera de vida y pronto esposa, quien sin lugar a dudas ha sido siempre un motor y un impulso para perseguir mis metas y alcanzarlas. Me ha acompañado en los altos y bajos. Ahora culmina una etapa pero comienza una nueva con nuevos retos y nuevas metas por alcanzar juntos. Gracias por permitirme compartir esta travesía a tu lado.

AGRADECIMIENTOS

A mi maestro y *chief*, Dr. Juan Luis Gómez Amador. Siempre con gran dedicación y entrega hacia esta bella especialidad. Nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo, orientación y enseñanzas. Un neurocirujano excepcional y vanguardista. Nunca olvidaré sus enseñanzas: “para ser un excelente neurocirujano se requiere conocimiento, habilidad y un par de pantalones bien puestos”.

A mis compañeros y en particular a mis compañeros de generación, Jorge Navarro, Mario A. Taylor, Juan José Ramírez y Alexander Perdomo. En esta vida no se puede navegar sólo y menos cuando la marea se eleva: gracias por ser el mejor equipo para cruzar este mar que dejamos atrás con éxito.

A todos mis maestros y profesores en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Todos líderes en sus áreas de especialización, todos expertos y sin duda punta de lanza de la neurocirugía Mexicana e internacional. No hay palabras para agradecerles lo que hacen por nuestro querido INNN y por todo el apoyo que recibí de cada uno.

A Alberto González, Benjamín Pineda y Roxana Magaña quienes fueron cómplices en el logro de este excelente trabajo. Sin sus conocimientos y siempre buena voluntad y disposición no se hubiera podido completar un trabajo de tan alta calidad.

INDICE

1. Resumen.....	6
2. Introducción y antecedentes.....	7
3. Planteamiento del problema.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	17
6. Justificación.....	18
7. Metodología.....	19
8. Resultados.....	28
9. Discusión.....	42
10. Limitaciones del estudio.....	47
11. Conclusiones.....	47
12. Consideraciones éticas.....	48
13. Perspectivas.....	49
14. Referencias.....	50
15. Apéndices.....	56

1. RESUMEN

El glioblastoma (GBM) es el tumor primario maligno más frecuente del sistema nervioso central, ocasionando, tan sólo en Estados Unidos, aproximadamente 12,000 muertes al año, además de que los tumores cerebrales son la segunda causa de muerte en niños después de las leucemias. En los últimos años, diversas investigaciones han intentado encontrar mejoras y nuevas opciones al tratamiento actual (que consiste en cirugía seguida de quimioterapia y radioterapia) aunque sin éxito significativo. Es por esta razón que resulta de vital importancia buscar alternativas terapéuticas que puedan mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con estas neoplasias. Recientemente la nanomedicina ha cobrado mucho interés debido a sus alcances y a los resultados alentadores que han sido publicados recientemente con el uso de nanopartículas. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los posibles efectos citotóxicos de los nanotubos de carbono multicapa (NTCPM) en líneas celulares de GBM RG2 así como en un modelo *in vivo*. **Metodología:** Se realizaron diversos ensayos en cultivos de células RG2 de GBM para determinar si los NTCPM (sin tratamiento, dopados con nitrógeno, funcionalizados y en combinación con temozolamida [TMZ]) tienen efectos citotóxicos, además de otros ensayos para determinar viabilidad celular, mecanismos de muerte celular inducidos y análisis del ciclo celular. Posteriormente se realizaron experimentos en un modelo animal con ratas Fischer 344, para valorar la toxicidad local y sistémica de la aplicación de los NTCPM así como su efecto en la supervivencia. **Resultados:** A través de los resultados obtenidos se puede observar un efecto citotóxico de los NTCPM por sí mismos y que se ve potenciado por la co-administración de TMZ; esto debido principalmente a la fragmentación del ADN de las células malignas, induciendo muerte celular por medio de apoptosis. Tras el estudio de resultados obtenidos del modelo *in vivo* se puede observar un aumento en la supervivencia global de las ratas tratadas con NTC funcionalizados (FN-NTC), en ausencia de datos clínicos y de laboratorio de toxicidad local o sistémica. **Conclusiones:** Con este estudio se pudo comprobar la hipótesis sobre los efectos citotóxicos de los NTCPM y se observó eficacia terapéutica con efectos tóxicos mínimos, lo cual justifica y sugiere continuar con estudios que amplíen en el conocimiento del uso y seguridad de los NTCPM como potencial opción terapéutica para GBM.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Definición y epidemiología del GBM

Los tumores primarios del sistema nervioso central tienen una incidencia de aproximadamente 30,000 casos/año en EE.UU. El glioblastoma (GBM) es el tumor primario más frecuente del encéfalo en adultos, constituyendo alrededor del 12-15% de las neoplasias intracraneales y el 60 – 75% de los tumores astrocíticos. La prevalencia de este tipo de tumores varía discretamente según la casuística de cada país, teniendo reportes de 2.9 nuevos casos por cada 100,000 habitantes en EE.UU, mientras que en Suiza se encuentra alrededor de 3.55 nuevos casos por cada 100,000 habitantes.^{1,2} Se ha reportado en la literatura un pico de incidencia alrededor de los 61 años de edad, siendo que el 80% de los casos se diagnostican a partir de los 50 años de edad y únicamente el 1% se diagnostican antes de los 20 años de edad.^{2,3} En México, en la serie reportada por Sotelo y cols. los gliomas representan el 33% de los tumores cerebrales y dentro de este grupo, el 28% corresponden a GBM; los datos peculiares de la población Mexicana es que el 51% de los GBM son detectados en pacientes menores a 50 años de edad.⁶⁰

La principal característica del GBM es la diferenciación astrocítica predominante. Aunque la mayoría de las veces se presenta como un tumor primario, el GBM puede también desarrollarse de forma secundaria resultado de una transformación de otros tumores astrocitarios, oligodendrogiales o mixtos.^{2,4} Aunque existen diversos subtipos de esta neoplasia, sobre los cuales se hablará más adelante, el GBM es un tumor correspondiente al grado IV de la OMS.^{4,5,6} Las localizaciones en donde se encuentran de forma más frecuente son el lóbulo temporal (31%), lóbulo parietal (24%), lóbulo frontal (23%) y lóbulo occipital (16%).²

2.2 Definición histopatológica y diagnóstico

Hasta la última clasificación de la OMS emitida en el 2007, la definición histopatológica del GBM, y de los tumores del sistema nervioso central (SNC) en general, se basaba únicamente en el fenotipo histopatológico (tipo de células precursoras, diferenciación), siendo que el GBM se caracterizaba por presentar atipia celular, pleomorfismo, actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación microvascular con patrón glomeruloide y necrosis en pseudoempalizado.^{2, 4, 6, 7} Sin embargo, en los últimos años se ha logrado comprender de forma más profunda los mecanismos de génesis tumoral, así como aspectos genéticos y moleculares de las neoplasias del SNC. La detección de alteraciones genéticas como la co-delección 1p/19q o mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa (IDH) o en el gen *ATRX*, eran tomadas en cuenta únicamente como factores pronóstico en algunos casos, sin embargo debido a la complejidad en el diagnóstico de estos tumores aunado a la gran variabilidad de hallazgos histopatológicos se encontró una alta variabilidad interobservador para el diagnóstico del GBM. Es por esto que en 2014 se llevó a cabo una reunión de neuropatólogos expertos en diagnóstico molecular en Haarlem, Holanda, avalada por la Sociedad Internacional de Neuropatología, en donde se emitieron guías para el diagnóstico de tumores del SNC. Este consenso dio pie a que en mayo 2016 se publicara la actualización a la clasificación de la OMS 2007 en donde se incorporan los elementos genéticos y moleculares para el diagnóstico del GBM.^{2,4,5,6,8}

De acuerdo a la actualización del presente año de la clasificación de la OMS, en el caso particular del GBM se ha incorporado como parte del diagnóstico histopatológico el estudio del IDH. En base a ello se definieron 3 tipos:⁶

1. GBM, IDH-nativa (wild-type)
 - a. GBM de células gigantes
2. GBM, IDH-mutante
3. GBM inespecífico (NOS, del inglés: “not otherwise specified”)

Durante la evaluación de los pacientes con GBM es imprescindible realizar una exploración clínica neurológica completa aunado a valoraciones correspondientes a la calidad de vida y

el estado funcional del paciente al momento del diagnóstico. Es de suma importancia realizar dichas valoraciones ya que de eso dependerá el seguimiento clínico y la elección de tratamiento. Para la valoración neurocognitiva se pueden utilizar diferentes pruebas como la de Hopkins, el *Trail making test* o la examinación de afasia multilingüal. En cuanto a la valoración del estado funcional las dos escalas más ampliamente utilizadas y que se han tomado en cuenta para la toma de decisiones son el índice de Karnofsky (IK) y la escala del ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), definiendo como un buen estado funcional un IK mayor a 70 o un puntaje 0-1 en la escala del ECOG.^{2,4}

2.3 Imagenología en GBM

El estudio de imagen de mayor importancia para el diagnóstico de GBM es la resonancia magnética (IRM) simple y contrastada de cráneo. Típicamente los GBM se observan como lesiones de características intrínsecas, con bordes irregulares, hipointensas en secuencia T1 en el centro (correspondiente a la presencia de necrosis), hiperintensos en secuencias T2 y FLAIR y presentan un reforzamiento en anillo característico ante la administración de gadolinio, con edema variable perilesional.^{2, 5, 9} En la mayoría de los casos este estudio es suficiente para realizar el diagnóstico, sin embargo en casos complejos o recidivantes es frecuentemente necesario hacer uso de otros estudios o secuencias de IRM para lograr un mejor diagnóstico diferencial. Entre las secuencias en IRM que se pueden utilizar como apoyo se encuentra la espectroscopia, en la cual se analiza la composición química de la lesión a estudiar, encontrando característicamente un aumento en el pico de Colina, disminución en el pico N-acetilaspártato y un pico variable de lactato.^{10, 11} Incluso en estudios recientes se ha descrito la detección de 2-hidroxiglutarato (2HG) por espectroscopia en GBM IDH-mutante.¹² Otras secuencias en IRM que resultan útiles para el diagnóstico de esta patología son la perfusión y difusión (DTI), siendo que los GBM son lesiones que muestran un aumento en la perfusión relativa con el tejido cerebral normal y no muestran restricción a la difusión (lo que permite realizar el diagnóstico diferencial con otras lesiones como abscesos cerebrales).^{13, 14} En las guías clínicas publicadas por Mukundan S, et al en 2008 sobre la evaluación de GBM de reciente diagnóstico nos emiten las siguientes recomendaciones:¹³

1. Nivel I:
 - a. Siempre que sea posible se recomienda realizar IRM con gadolinio ya que provee información importante para la diferenciación del GBM de otros tumores intrínsecos y secundarios.
2. Nivel II:
 - a. La tomografía (TAC) con medio de contraste puede proveer información útil para la diferenciación del GBM de otros tumores intrínsecos y secundarios.
3. Nivel III:
 - a. La adición de espectroscopia a la IRM anatómica estándar provee detalles que pueden mejorar la certeza diagnóstica para lesiones cerebrales, incluyendo los tumores.
 - b. El uso de perfusión en IRM con determinación del volumen sanguíneo medio regional puede proveer información que apoye en la diferenciación de las características histológicas entre los tumores intrínsecos.

2.4 Opciones terapéuticas

El tratamiento para el GBM es un tema sumamente debatido debido a la gran cantidad de investigación que se está llevando a cabo y debido a que hasta el día de hoy no se cuenta aún con algún protocolo de tratamiento curativo. En esta sección se discutirán las generalidades de las mejores opciones terapéuticas con base a la literatura más actual.

El tratamiento del GBM se basa principalmente en resección quirúrgica seguida de tratamiento complementario con radioterapia (RT) y quimioterapia (QT). Sin embargo no todos los pacientes recibirán el mismo esquema, ya que para tomar una decisión terapéutica es necesario valorar diversos factores como la edad, la localización del tumor (área elocuente/no elocuente, superficial/profundo), estado funcional del paciente (IK), tamaño de la lesión, posibilidades de resección máxima segura, diagnóstico *de novo* o recurrencia y voluntad del paciente de someterse a las diversas opciones terapéuticas de acuerdo a las probabilidades de supervivencia y riesgos funcionales.^{2,5,16}

La cirugía tiene 3 principales objetivos:²

1. Fuente de muestra para el estudio histopatológico (biopsia guiada por neuronavegación o estereotaxia/abierta).
2. Disminución de la presión intracraneana.
3. Mejoría del pronóstico de supervivencia total (siguiendo el principio de resección máxima *segura*).

Es de suma importancia resaltar el término de resección máxima *segura*, que nos indica que debemos de tomar en cuenta las probabilidades de realizar una resección máxima sin comprometer la vida o función del paciente.^{2,5} Anteriormente se planteaba el paradigma de “todo o nada” con respecto a porcentajes de resección como factores pronóstico para supervivencia total, sin embargo este concepto ha ido cambiando hacia reseccionar “tanto como sea seguro”, como ha sido evidenciado en un meta-análisis publicado por el grupo del Dr. Quiñones en 2015. En dicha publicación se concluye que más que el porcentaje de resección, el volumen residual de tumor post-resección en secuencia de IRM T1 contrastado es el principal predictor radiológico de supervivencia.¹⁵ Basados en el principio de “resección máxima *segura*” se han ido desarrollando técnicas nuevas para lograr resecciones más amplias y de forma más segura, combinando técnicas anatómicas y funcionales como es la neuronavegación, el uso de ácido-5-aminolevulínico (5-ALA), resecciones guiadas por ultrasonido (USG), IRM funcionales (IRMf), IRM intraoperatorias y estimulación cortical y subcortical para identificación de áreas o trayectos funcionales.^{2,5, 15, 17} Incluso, en casos seleccionados, se puede complementar el tratamiento quirúrgico con aplicación de QT local como son las obleas de carmustina, que se pueden colocar en el lecho quirúrgico de resecciones completas del GBM. Aunque existe literatura aún controversial en cuanto a esta práctica, los meta-análisis recientes sugieren que la aplicación de obleas de carmustina en el lecho quirúrgico puede mejorar la supervivencia, sin embargo se requieren mayores estudios para apoyar esta hipótesis.^{2,18}

De acuerdo a las características particulares de cada paciente se debe seleccionar el tratamiento más adecuado, de tal manera que es posible clasificar a los pacientes según lo mencionado en la literatura en mayores o menores de 70 años y con IK mayor o menor a 70

(pacientes independientes o dependientes). Para pacientes menores de 70 años y con $IK > 70$ el tratamiento indicado según las guías norteamericanas es resección máxima segura seguida de RT y QT de acuerdo al protocolo Stupp.^{2, 5, 19, 20} Siguiendo las recomendaciones del estudio clínico fase III de RSP/ANOCEF, los pacientes mayores de 70 años de edad con un $IK > 70$ deben de recibir tratamiento con radioterapia (60Gy en 30 sesiones) sin quimioterapia como terapia estándar. Estudios fase III publicados recientemente, sugieren que los tratamientos hipofraccionados de RT (34Gy en 10 sesiones) tienen resultados estadísticamente similares a la terapia estándar.^{2, 21, 22, 23} Para los pacientes mayores de 70 años y con $IK < 70$ la terapia estándar se basa únicamente en cuidados paliativos, sin embargo en estudios recientes se ha sugerido que el tratamiento con temozolamida (TMZ) en este grupo de pacientes puede ser beneficioso ya que ofrece una supervivencia global de 6 meses y el 25% de los pacientes recuperan su autonomía.^{2, 23, 24} Existen incluso ya algunos estudios que comienzan a reportar la viabilidad de administración de RT hipofraccionada concomitante con TMZ en este grupo de pacientes con buenos resultados.²⁵

Otro tema importante de analizar en cuanto a las opciones terapéuticas del GBM son las llamadas terapias dirigidas. Este grupo de fármacos que han aparecido de forma más reciente se encuentran aún bajo investigación y ha habido reportes con diferentes resultados. En las revisiones más recientes y guías clínicas se han hecho revisiones sobre estos fármacos. Previamente se había reportado que el Bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) era útil únicamente en GBM recidivante, sin embargo estudios recientes sugieren que puede ser utilizado como terapia de primera línea en combinación con temozolamida.^{2, 5, 26} En las guías clínicas más recientes sobre el uso de terapias dirigidas para el tratamiento de GBM recidivante, se emiten las siguientes recomendaciones con nivel de evidencia clase III:²⁷

1. El tratamiento con Bevacizumab se recomienda ya que ofrece un mejor control de la enfermedad y mayor supervivencia libre de progresión a 6 meses.
2. Debido a que existen un gran número de opciones terapéuticas para GBM recidivante que pueden ser utilizadas bajo circunstancias selectas, es importante involucrar a los pacientes en estudios clínicos bien definidos para encontrar la mejor evidencia y la mejor opción terapéutica para cada paciente.

2.5 Pronóstico

En la actualidad, el pronóstico de los pacientes con diagnóstico reciente de GBM es aún pobre a pesar de los avances y los estudios que se han realizado. Hasta el día de hoy el promedio de supervivencia a partir del diagnóstico es de 15 – 18 meses siguiendo el mejor tratamiento hasta la actualidad, como ha sido mencionado anteriormente en el trabajo. Los reportes más optimistas de supervivencia a largo plazo (5 años) alcanzan únicamente 9%. De igual manera la supervivencia libre de progresión con tratamiento óptimo es de 6.9 meses.^{28, 29, 30} Es por este motivo que es necesario continuar una ardua búsqueda para encontrar nuevas opciones terapéuticas que ofrezcan a los pacientes no sólo supervivencia más prolongada sino que tengan una mejor calidad de vida.

2.6 Nanotubos de carbono

Debido a la insuficiente respuesta a los tratamientos actuales, se han desarrollado nuevos agentes que intentan contribuir al tratamiento de los gliomas. En años recientes, las nanopartículas han sido objeto de diversos estudios debido a su biocompatibilidad y mínima toxicidad. Los nanotubos de Carbono (NTC) representan un importante grupo de nanomateriales con propiedades geométricas, mecánicas y de alta conductividad eléctrica y química utilizados para diversas aplicaciones. Los NTC consisten en hojas de grafeno enrolladas de forma cilíndrica con una alta relación de aspecto y un diámetro en el rango nano-escala. Existen dos tipos principales en cuanto a su estructura; los nanotubos de pared simple o única (NTPS), constituidos por una sola lámina de grafito envuelto en un tubo cilíndrico y los nanotubos de pared múltiple o multicapa (NTCPM), constituidos por dos o más láminas que se pliegan en torno a un eje. Una de las principales características que hacen que los NTC sean de sumo interés para la nanomedicina y en particular para el tratamiento de GBM, es su capacidad de atravesar barreras biológicas, lo cual en el caso particular de nuestro estudio es de suma importancia ya que de ello depende su entrada al SNC además de su potencial uso como acarreadores de fármacos.^{31, 40} Un dato interesante que ha aportado datos sobre este tema es el hecho que las nanopartículas de carbono, incluyendo a los NTCPM, han sido utilizadas como biomateriales para producción

industrial, lo cual detonó la preocupación por conocer si dichos componentes tenían algún efecto sobre el cuerpo humano y a raíz de ello se han llevado a cabo estudios donde se demuestra que efectivamente los NTCPM cuentan con efectos citotóxicos por sí mismos, al causar daño directo al ADN del núcleo celular, de ahí que podamos inferir que siendo utilizados correctamente podrían representar un potencial tratamiento para GBM.^{33,34}

Los NTC han sido objeto de interés para el diagnóstico y tratamiento debido a su capacidad para el transporte y la liberación de quimioterapia citotóxica. Además pueden ser funcionalizados para aumentar su biodisponibilidad. Asimismo por su tamaño son capaces de transitar libremente a través del torrente sanguíneo y atravesar la barrera hematoencefálica, el epitelio estomacal y pueden ser filtrados por el bazo y el riñón. Estudios previos han demostrado que los NTC funcionalizados (FN-NTC) pueden ser internalizados en las células. De igual manera se ha observado que los FN-NTC son capaces de atravesar la membrana plasmática para alcanzar la región perinuclear después de dos horas de incubación^{31, 32}, convirtiéndose en una gran alternativa para el tratamiento de los GBM. Entre los estudios más recientes se ha reportado la utilidad de este tipo de tratamiento, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, utilizando diferentes técnicas y protocolos. Entre las publicaciones más significativas en este respecto se encuentran las siguientes. Lu, et al, realizaron un estudio en cultivos celulares donde evaluaron la capacidad de transporte de doxorrubicina con nanotubos de carbono multicapa funcionalizados y conjugados con ácido fólico dirigido a ligando y combinados con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, realizando de esta manera un combinado magnético-químico que otorgaba características de selectividad y transporte del medicamento hacia las células tumorales donde eran internalizados, dejando el transportador en el citoplasma e introduciendo la doxorrubicina al núcleo celular³⁵. En otro estudio sobre transporte de fármacos con NTC, Moore Th, et al, reportaron la efectividad de NTC funcionalizados y acoplados a un revestimiento multicapa de poliglicólido y poliláctido como transporte de Dasatinib en cultivos celulares, donde se observó una mayor eficacia que los nanotubos monocapa (que suelen presentar una liberación inicial “en explosión” del fármaco, lo cual disminuye la entrega por tiempos prolongados del medicamento).³⁶

En una publicación más reciente por Santos T, et al, reportan un estudio *in vitro* e *in vivo* en modelos animales con ratas donde evaluaron el uso de NTC combinados con radiación casi-infrarroja. El estudio se basa en el principio que este tipo de radiación causa efectos mínimos en tejidos sanos y debido a las propiedades físico-químicas de los NTC crean un efecto vibratorio resultando en generación de calor, lo cual potencialmente crea muerte celular secundaria a la hipertermia. En sus resultados reportan que los NTC fueron internalizados mayormente por células tumorales que por células sanas, dando cierta selectividad por células malignas. Asimismo reportaron que tanto las células cultivadas *in vitro*, como en las ratas implantadas mostraron reducción en los tamaños tumorales. Más aún detectaron que la disminución del tamaño tumoral era dosis-dependiente logrando desaparición completa del tumor a dosis de 3µg/mL de NTC sin evidencia de recurrencia a 80 días del tratamiento. De esta manera lograron demostrar una opción terapéutica efectiva y con mínimos efectos sobre el tejido sano. Estos reportes incluyeron células de tumores fármaco-sensibles, fármaco-resistentes e incluso en células madre formadoras de tumores gliales.³⁷

Otra publicación relevante para el estudio fue aquella realizada por Ouyang, et al en enero 2016, en la cual realizaron un estudio en un modelo de ratas con implante de células tumorales de glioma (K-luc) tratadas con inmunoterapia con oligonucleótidos de CpG asociada a NTC y temozolamida. En los resultados publicados reportaron que esta combinación resultó en una inducción de células efectoras con mayor capacidad de inducción de muerte celular en sus células blanco que en estudios previos sin temozolamida e incluso que la temozolamida por sí misma.³⁸

Un tema de particular importancia en el tratamiento del glioblastoma es el hecho que muchos fármacos son ineficaces para su tratamiento debido a que carecen de capacidad de cruzar la barrera hemato-encefálica (BHE). Se ha reportado que Angiopep-2 (ANG), un ligando para la proteína-1 relacionada a receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1), ha demostrado ser un ligando blanco prometedor para el transporte cerebral de fármacos a través de nanopartículas. En este respecto, Kafa H, et al, realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* para investigar la capacidad de NTC multicapa funcionalizados y dirigidos

contra ANG para cruzar la BHE. Al utilizar NTC delgados y gruesos acoplados a ANG encontraron que los NTC delgados tenían una mayor concentración en parénquima cerebral que los gruesos, indicando que el diámetro se encuentra directamente relacionado con la capacidad de atravesar la BHE. Asimismo encontraron que los NTC acoplados a ANG tuvieron mayor penetración al parénquima cerebral que los no acoplados. De esta manera lograron demostrar que una de las características que vuelven a los NTC muy atractivos como potencial acarreador de fármacos o tratamiento por sí mismos es su tamaño, además de la posibilidad de funcionalizarlos con compuestos que los vuelven más selectivos y que aumentan su permeabilidad en la BHE.³⁹ Esta capacidad de los NTC para ser utilizados como acarreadores de fármacos ha sido ya estudiada y reportada previamente también en otras patologías como el Alzheimer. Siendo que un trabajo publicado por Yang Y et al, donde en un modelo animal de Alzheimer determinaron que los lisosomas son los blancos farmacológicos para los NTCPS a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones también las mitocondrias los internalizan, siendo esta la causa de citotoxicidad, por lo que al controlar las concentraciones los autores lograron acarrear acetilcolina a los cerebros de las ratas estudiadas con un rango alto de seguridad.⁴¹ En un estudio más reciente se reprodujeron resultados similares en relación a la citotoxicidad de los NTCPM. Donde encontraron que los NTCPM inducen apoptosis en osteoclastos por medio de activación de vías de muerte celular mediadas por la mitocondria, caracterizadas por condensación nuclear, fragmentación del ADN, activación de caspasa-3 y escisión de polimerasa poli ADP-ribosa (PARP).⁴²

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Pregunta de investigación

¿Tienen los nanotubos de carbono multicapa efectos citotóxicos sobre líneas celulares de glioblastoma en un modelo *in vitro* así como *in vivo*?

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis nula

Los Nanotubos de carbono multicapa (NTCPM) no tienen efectos citotóxicos sobre líneas celulares de glioblastoma *in vitro* como *in vivo*.

4.2 Hipótesis alterna

Los Nanotubos de carbono multicapa (NTCPM) tienen efectos citotóxicos sobre líneas celulares de glioblastoma *in vitro* como *in vivo*.

4.3 Hipótesis de trabajo

Dadas las características intrínsecas de los nanotubos de carbono multicapa y a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y de ser endocitados por células tumorales, este tipo de nanopartículas tendrán efectos citotóxicos sobre líneas celulares de glioblastoma tanto *in vitro* como *in vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primario:

- Determinar el efecto citotóxico de los nanotubos de carbono multicapa sobre la línea celular RG2 de Glioblastoma en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Objetivos secundarios:

- Evaluar la selectividad de los nanotubos de carbono multicapa por células tumorales de glioblastoma de la línea RG2.
- Determinar el mecanismo de muerte celular inducido por los NTC.
- Valorar los efectos sistémicos secundarios de la aplicación de nanotubos de carbono multicapa en un modelo animal.
- Comparar el tiempo de supervivencia global de las ratas tratadas con NTC.

6. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado previamente, el GBM es el tumor maligno primario del SNC más frecuente y por lo tanto es tema de amplia investigación. Sin embargo, hasta el día de hoy y con los avances más modernos que se han podido realizar a nivel mundial, no se ha logrado encontrar algún tratamiento o combinación de ellos que sean curativos. El pronóstico de los pacientes a quienes se les realiza este diagnóstico no se ha logrado modificar significativamente en las últimas décadas y es por esto que gran cantidad de investigación y recursos se han derivado para este tema. El esquema actual de cirugía (en todas sus modalidades) seguida de quimio y radioterapia ha logrado otorgar a los pacientes aproximadamente 2 – 4 meses únicamente de mayor sobrevivencia, lo cual ha dado pie a que los protocolos de investigación viren sus ojos hacia nuevos horizontes y nuevas técnicas y tecnologías. El tema de nanomedicina ha ganado mucho valor en los últimos años, no sólo en el campo de las neurociencias sino en la medicina en general, ya que ha abierto un nuevo panorama y una opción tanto de terapéutica, como de creación de materiales, instrumentos y componentes así como medios de transporte de fármacos. Dentro del gran número de nanopartículas que existen los NTC representan un subtipo de sumo interés para las neurociencias general y para el GBM en particular debido a que poseen características físico-químicas y morfológicas que los hacen potencialmente ideales para su uso en el SNC. Debido a su tamaño, su composición y su capacidad de funcionalización, entre otras, los NTC son capaces de atravesar barreras biológicas (como la BHE), lo cual permite teóricamente que puedan alcanzar el parénquima cerebral y finalmente las células tumorales. Además ya ha sido demostrado previamente, en estudios con células distintas a las del SNC, que los NTC por sí mismos cuentan con propiedades citotóxicas e incluso pueden ser utilizados como acarreadores de fármacos. Toda esta información apunta a la pertinencia de explorar el hecho de utilizarlos para el estudio del tratamiento del GBM, ya que si es posible comprobar que los NTC pueden atravesar la BHE y se logra determinar una especificidad por células tumorales se podría encontrar una opción terapéutica eficaz, segura y con posibilidad de mejorar el pronóstico de los pacientes, ya sea por sí misma o en combinación con las opciones existentes hasta el día de hoy.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivos Celulares

Las líneas celulares tumorales RG2 de GBM fueron adquiridas del ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). Las células fueron cultivadas en medio Eagle de Dulbecco (DMEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY, EE.UU.) y suplementadas con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL), 4 mM de glutamina y 100U/mL de penicilina-estreptomicina. Posteriormente fueron cultivadas en condiciones estériles a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Los astrocitos fueron aislados de ratas Fisher de 3 días de edad, como ha sido publicado previamente en la literatura.⁴³ El cuidado de los animales y el uso de todos los animales de experimentación fueron llevados a cabo bajo los más estrictos cuidados y en acuerdo con las guías éticas institucionales.

7.2 Características de los Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM)

Los nanotubos de carbono fueron donados por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT). En la actualidad estos NTC son utilizados en la industria en sensores, para propiedades magnéticas, emisión de campo y biocompatibilidad, entre otras. Todos los grupos de NTC utilizados en el presente trabajo fueron de pared múltiple o multicapa (NTCPM), teniendo cada grupo características distintas como se describe a continuación.

Se utilizaron cuatro grupos de NTC (Figura 1):

- Grupo 1: Nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (NTC-N).
- Grupo 2: Nanotubos de carbono dopados con nitrógeno y funcionalizados (FN-NTC-N).
- Grupo 3: Nanotubos de carbono (NTC).
- Grupo 4: Nanotubos de carbono funcionalizados (FN-NTC).

Los NTCPM (Grupo 3) se obtienen utilizando tolueno como fuente de átomos de carbono y sin colocarles ningún tipo de tratamiento. Los NTC dopados con nitrógeno (Grupo 1 y 2) son fabricados utilizando una solución de bencilamina ($C_6H_5CH_2NH_2$) y ferroceno ($Fe(C_5H_5)_2$), a través del método de deposición química de vapor asistida por aerosol (AACVD); la bencilamina se utiliza para incorporar átomos de nitrógeno a la red gráfica de los NTCPM además de ser una fuente de átomos de carbono y el ferroceno se utiliza para generar hierro (Fe) y nanopartículas de carbono y Fe que son catalizadoras para la producción de NTC. A través de este proceso se logra que la red gráfica del NTC contenga átomos de nitrógeno (N), lo cual le confiere propiedades eléctricas aumentadas. La funcionalización de los NTC (Grupos 2 y 4) se realiza con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico para modificar su pH con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de hierro (Fe) y alcanzar un pH cercano a 7.

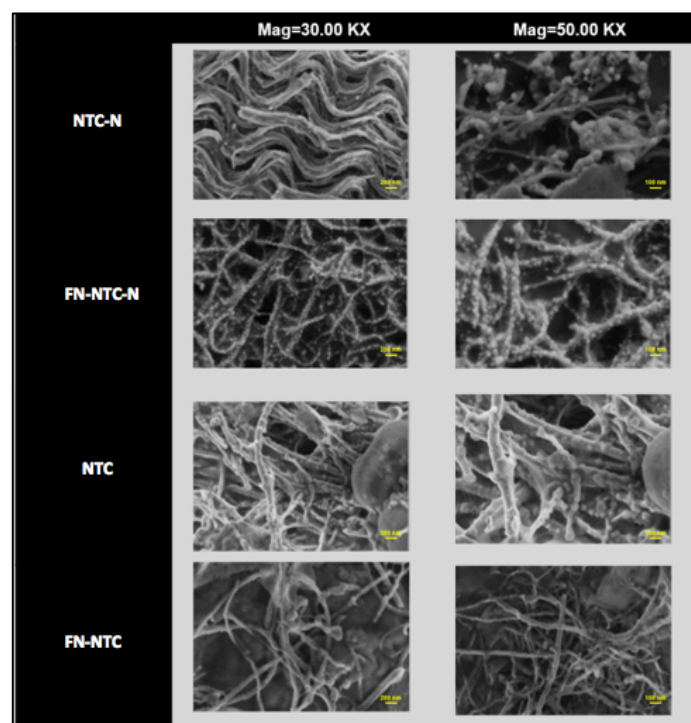


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los 4 grupos de nanotubos de carbono multicapa utilizados. NTC = nanotubos de carbono, FN = funcionalizados, N = dopados con nitrógeno, Mag = magnificación

Los NTC fueron posteriormente suspendidos en medio Hanks (Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.) para obtener la concentración de NTC (1mg/mL). Las concentraciones finales fueron realizadas en medio de cultivo (DMEM) sin suero fetal bovino. Posteriormente se realizó una breve sonicación de los compuestos antes de dar tratamiento a las células.

Asimismo, para determinados experimentos dentro del presente estudio los 4 grupos de NTC fueron combinados con Temozolamida (TMZ) (Sigma Aldrich) para formar los siguientes grupos:

- Grupo 5: NTC-N + TMZ
- Grupo 6: FN-NTC-N + TMZ
- Grupo 7: NTC + TMZ
- Grupo 8: FN-NTC + TMZ

7.3 Procedimientos realizados in vitro

7.3.1 Determinación de la dosis letal 50% (DL_{50})

Para determinar la dosis efectiva de los diferentes NTC sobre astrocitos y células de GBM RG2 las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (1×10^5 células) y tratadas a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y $100 \mu\text{g/mL}$). Después de 24 horas las células fueron colectadas y fueron teñidas con Ioduro de Propidio por 15 minutos y analizadas por medio de citometría de flujo.

7.3.2 Análisis de funcionalidad celular

Se realizó la determinación de funcionalidad celular mediante el ensayo de MTT en la línea de GBM RG2. La prueba de MTT es utilizada actualmente como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria (medidor de actividad metabólica) o como un índice del estado funcional general de la célula. En células viables se lleva a cabo la formación de sales de formazan a través de la actividad de deshidrogenasas, por lo tanto se realiza una

medición por densidad óptica a una longitud de onda de 570nm para detectar el producto azul de formazan. De esta manera los resultados se expresaron como el porcentaje de reducción de MTT en relación a los valores control. Para ello las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (1×10^4) y posteriormente divididas en 1 grupo control, 8 grupos tratados con los 8 tipos de NTC y 1 grupo tratado con TMZ ($10 \mu\text{M}$) únicamente. Una vez completada la preparación con método MTT, las células se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células/mL y la placa fue leída por citometría de flujo. Tras realizar los preparados para análisis por citometría de flujo, los grupos celulares se analizaron 1 hora posterior al tratamiento. Se valoraron 10,000 eventos. La información fue colectada por el instrumento FACSCalibur (BD Biosciencias). Para el análisis de la información se utilizaron los softwares Cell QuestPro y Flow Jo ver 7.6.1.

7.3.3 Determinación de mecanismos de muerte celular

7.3.3.A. Detección de apoptosis mediante ensayo de Annexina V y doble tinción de 7-amino-actinomicina D (7AAD)

Tras la determinación de viabilidad celular por medio del ensayo de MTT, los cultivos celulares tratados se prepararon para la realización del ensayo de Annexina V y doble tinción de 7AAD, los cuales son marcadores celulares de apoptosis, ya que la Annexina V es una proteína de membrana y el 7AAD y el ioduro de propidio (PI) son tinciones que no atraviesan la membrana celular, por lo que únicamente se adhieren y marcan al DNA de células necróticas. Una vez terminada la preparación de los cultivos en este ensayo se realizó el análisis por medio de citometría de flujo, en donde se utilizó la gráfica de puntos en 4 cuadrantes para distinguir las células normales (Annexina V-/PI-), en apoptosis temprana (Annexina V+/PI-), apoptosis tardía (Annexina V+/PI+) y necróticas (Annexina V-/PI+).^{44, 45}

7.3.3.B Potencial Membrana Mitocondrial

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial, así como la modificación en el mismo, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (1×10^5) y 24 horas después tratadas con los 8 grupos de NTC previamente mencionados, además del grupo control y el grupo únicamente de TMZ. Posteriormente se utilizó el colorante lipofílico catiónico fluorescente iodado 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-carbocianina (JC-1) (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU) para determinar el potencial de membrana mitocondrial. Como se ha descrito, al realizar citometría de flujo, en las mitocondrias con bajo potencial de membrana el JC-1 se encuentra en su forma monomérica y muestra una fluorescencia verde, mientras que en la matriz mitocondrial, con alto potencial de membrana, el JC-1 forma agregados con fluorescencia roja. Por lo tanto la presencia de fluorescencia verde es indicativa de masa mitocondrial, mientras que la presencia de fluorescencia roja es indicativa de potencial de membrana mitocondrial. Los datos se expresan como el índice medio de fluorescencia (IMF) en el canal FL- 2 (fluorescencia roja).⁴⁶

7.3.3.C Análisis de Autofagia por LC3

La autofagia es una vía normal de degradación celular que involucra el secuestro de porciones citoplasmáticas y organelos intracelulares en una membrana vacuolar llamada autofagosoma. Estas vacuolas se fusionan con lisosomas para ser degradadas. La cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (LC3) es esencial para el desarrollo de esta vía y se encuentra asociada a la membrana del autofagosoma, principalmente en su forma LC3-II (formada a partir de la unión de LC3-I con fosfatidiletanolamina), la cual se ha demostrado que tiene una correlación con la cantidad de formación de autofagosomas y es por eso que se ha utilizado como marcador de autofagia.^{47, 48} Para este fin las células sembradas fueron preparadas y se agregó el anticuerpo (Ac) primario anti-LC3 y posteriormente el Ac secundario acoplado al fluoróforo (para marcar con color fluorescente el Ac primario) y finalmente 10,000 eventos fueron evaluados por citometría de flujo.

7.3.3.D Análisis de autofagia por detección de vesículas autofágicas (AVOs) con tinción de naranja de acridina

Como se mencionó previamente, el proceso de autofagia se caracteriza por la formación de vesículas autofágicas, también llamados organelos vesiculares ácidos (AVOs). Existe un agente lisosomotrópico llamado acridina naranja el cual se mueve libremente a través de las membranas biológicas cuando se encuentra sin carga, sin embargo su forma protonada se acumula en los compartimentos celulares ácidos, donde forma agregados que emiten una fluorescencia roja brillante. Las células teñidas con naranja de acridina presentan fluorescencia verde brillante en el citoplasma y una fluorescencia roja oscura en el núcleo, mientras que en los compartimentos ácidos presentan una fluorescencia roja brillante. De esta manera se puede medir la cantidad de fluorescencia roja intensa la cual permite cuantificar el volumen del compartimiento celular ácido, lo que traduce formación de AVOs.^{49,50}

Posterior al tratamiento de las células como se ha descrito previamente, fueron teñidas con naranja de acridina (5 µg/ml) y la fluorescencia verde (FL-1) y roja (FL-3) del naranja de acridina fue medida mediante citometría de flujo. La suma de los cuadrantes superior izquierdo y superior derecho del gráfico de puntos fue utilizado para representar el porcentaje de autofagia. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

7.3.3.E Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron detectadas por medio de la aplicación de fluorescencia 2'-7' diclorofluoresceína de diacetato (DCFH-DA) de acuerdo a protocolos ya pre-establecidos, debido a que permite realizar una medición cuantitativa por medio de fluorescencia de la formación de ROS.^{51, 52} Para este fin las células RG2 de GBM fueron pre-incubadas con DCFH-DA durante 10 minutos para permitir su difusión hacia la células. Posteriormente se incubaron con los diversos grupos de NTC como comentados previamente durante 1 hora (cuando se detectaron niveles intracelulares de ROS) y a tiempos variables (30 minutos, 60 minutos, 3 y 6 horas) cuando se realizó detección de

ROS en espacio extracelular. La detección intracelular de ROS se llevó a cabo por medio de citometría de flujo y los ROS extracelulares se detectaron por medio de espectrometría de fluorescencia en el supernadante. Los resultados se expresaron como porcentaje de formación de ROS en los grupos tratados Vs grupo control.

7.3.4 Análisis del ciclo celular

Las células fueron sembradas e incubadas y posteriormente tratadas con los diferentes grupos de NTC. Después de 24 horas de incubación, se recogieron las células, se fijaron y tras la preparación adecuada se pre-incubaron con RNasa y PI durante 30 minutos en oscuridad. Seguidamente se realizó el análisis de fase de ciclo celular utilizando el software de análisis de ciclo celular Modifit desarrollado con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA).

7.4 Procedimientos realizados in vivo

7.4.1 Tratamiento in vivo

Previo a la implantación intracraneal de los NTC, las células RG2 de GBM fueron separadas de los medios de cultivo por medio de una tripsinización breve, posteriormente fueron centrifugadas y resuspendidas en el medio correspondiente y fueron agitadas regularmente para evitar sedimentación celular. Estas suspensiones fueron mantenidas en un vial estéril a 4°C hasta su implantación.

7.4.2 Modelo ortotópico de glioma

Para el modelo de implantación de células RG2 de GBM en ratas se incluyeron 50 ratas macho Fischer 344 (Bioinvert, Ciudad de México), de 3 meses de edad y fueron alimentadas *ad libitum*. El procedimiento de implantación celular se llevó a cabo basados en la metodología descrita por Kobayashi et al.⁵³ Para la implantación se anestesió a las ratas con Ketamina (40-90mg/Kg) intraperitoneal + Xylazina (5-10mg/Kg) subcutánea,

posteriormente se colocaron en el marco estereotáctico (Stoelting Co., WoodDale, IL, EE.UU). Posteriormente se realizó asepsia y tras la realización de un trépano 2mm a la derecha y 2mm anterior a la bregma, se implantó 1×10^6 células de GBM RG2 suspendidas en 10 μ L de solución salina a 3mm de profundidad en relación a la duramadre a una velocidad de 2 μ L/min y se esperó por 2 minutos.

Posterior a la implantación de células tumorales las ratas se dividieron en 5 grupos (n = 10 por cada grupo) de acuerdo al tratamiento a recibir (todos los grupos de NTC fueron implantados a una dilución de 25 μ g en 25 μ L de solución salina). La implantación de los NTC se realizó 2 días posteriores a la implantación de las células tumorales:

- Grupo A (control): sin tratamiento
- Grupo B: NTC grupo 1 (NTC-N)
- Grupo C: NTC grupo 2 (FN-NTC-N)
- Grupo D: NTC grupo 3 (NTC)
- Grupo E: NTC grupo 4 (FN-NTC)

Para todos los grupos de ratas se midió el tiempo de supervivencia a partir de la implantación de las células tumorales.

7.4.3 Análisis de toxicidad en parámetros hematológicos y bioquímicos

Tras 21 días de haber sido realizado el implante de los NTC, se tomaron 5 ratas de cada grupo y tras la administración de anestesia se tomaron muestras sanguíneas por punción intracardiaca para el análisis hematológico y bioquímico. A dichas muestras sanguíneas se les realizaron biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática y renal y se compararon con resultados de 5 ratas sanas (sin tratamiento y sin implante de células de GBM) que fueron tomadas como control.

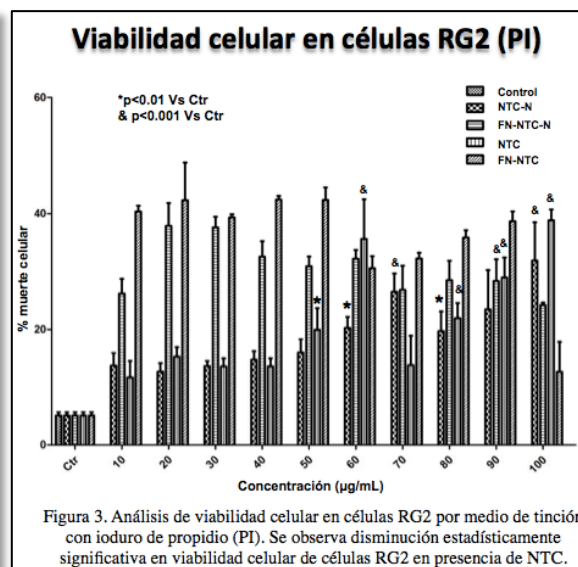
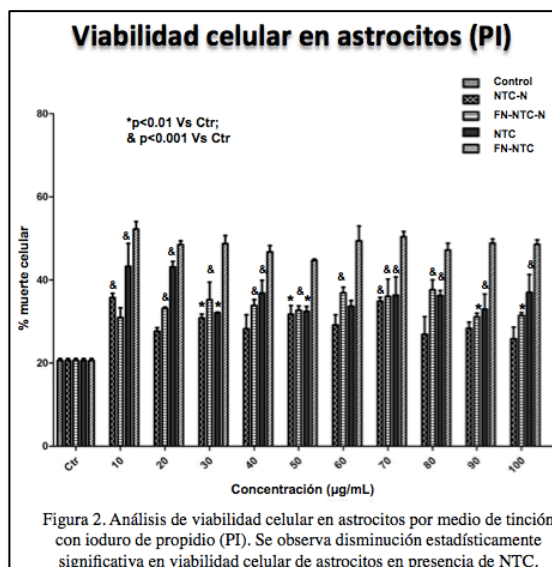
Análisis Estadístico

Los datos se expresan como media \pm DE. Se determinó la significancia estadística mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples HSD de Tukey utilizando el software SPSS (11,5). Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia global y Log Rank para las diferencias entre las curvas. Se consideró como estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

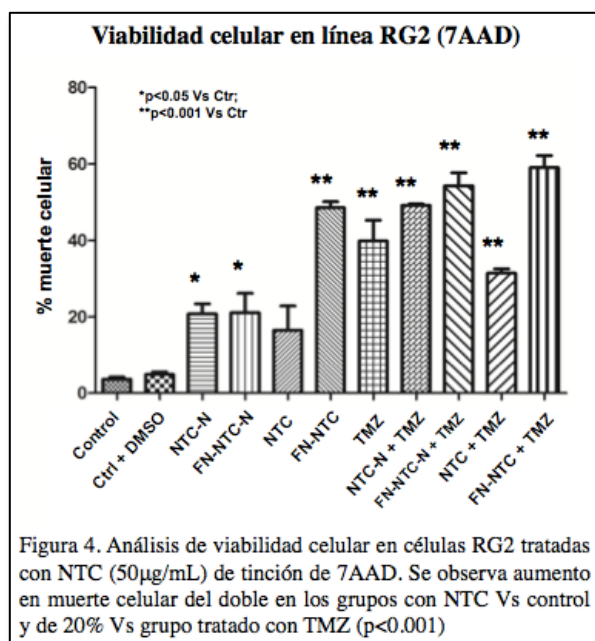
Los NTC inhiben la viabilidad de astrocitos y de células de GBM de ratas RG2

Como se puede observar en las Figuras 2 y 3, la viabilidad no se vio afectada en forma dosis-dependiente sino que se observó un efecto inhibitorio con todos los grupos de NTC, incluso a concentraciones por arriba de los 20 μ g/mL. Al realizar una comparación con los controles (células cultivadas en medio sin nanopartículas), el porcentaje de viabilidad determinado ya sea por método de Ioduro de Propidio (PI) o 7AAD se vio disminuido en los 4 grupos de NTC utilizados. A pesar de encontrar una disminución en la viabilidad celular en todos los grupos, el grupo 4 (FN-NTC) fue el que mostró el mayor porcentaje de inhibición tras el mismo tiempo de exposición alcanzando un 50% tras 24 horas de incubación tanto en astrocitos como en células RG2 (Figuras 2 y 3). A raíz de estos hallazgos se decidió utilizar el tratamiento por 24 horas a una concentración de 50 μ g/mL para todos los experimentos subsecuentes, ya que a dicha concentración se observó el mejor balance entre dispersión y arresto de viabilidad celular.



Los NTC en combinación con TMZ aumentan el porcentaje de muerte celular

Como se mencionó previamente, se realizó un análisis de viabilidad celular utilizando 7AAD en células RG2 tratadas con los 8 grupos de NTC. Los resultados obtenidos indicaron que al agregar TMZ junto con los NTC indujeron un aumento en el porcentaje de muerte celular de hasta el doble en comparación con las células tratadas únicamente con NTC (Grupos 1 – 4, $p < 0.05$), y un aumento más discreto (20%, $p < 0.001$) en comparación con el grupo tratado únicamente con TMZ (Figura 4).



Los NTC funcionalizados cuentan con mayor biodisponibilidad que los no funcionalizados

Los NTC funcionalizados, tanto dopados como no dopados (Grupos 2 y 4), presentaron un mayor porcentaje de fagocitosis que su contraparte los no funcionalizados. Esto se pudo evidenciar durante la citometría de flujo al observar que los NTC no funcionalizados (Grupos 1 y 3) no ocasionaron un aumento en el tamaño celular, mientras que los NTC funcionalizados (Grupos 2 y 4) ocasionaron un aumento de tamaño al doble en comparación con las células control (Figura 5a). Al agregar TMZ a los cultivos celulares tratados con NTC (Grupos 5 a 8) no se observó modificación en la entrada de NTC a las células malignas (Figura 5b). Se pudo demostrar que la funcionalización de los NTC permitió una mejor distribución evitando de esa manera la formación de agregados y por lo tanto resultando en un mayor porcentaje de fagocitosis tanto por las células RG2 de GBM como por los astrocitos.

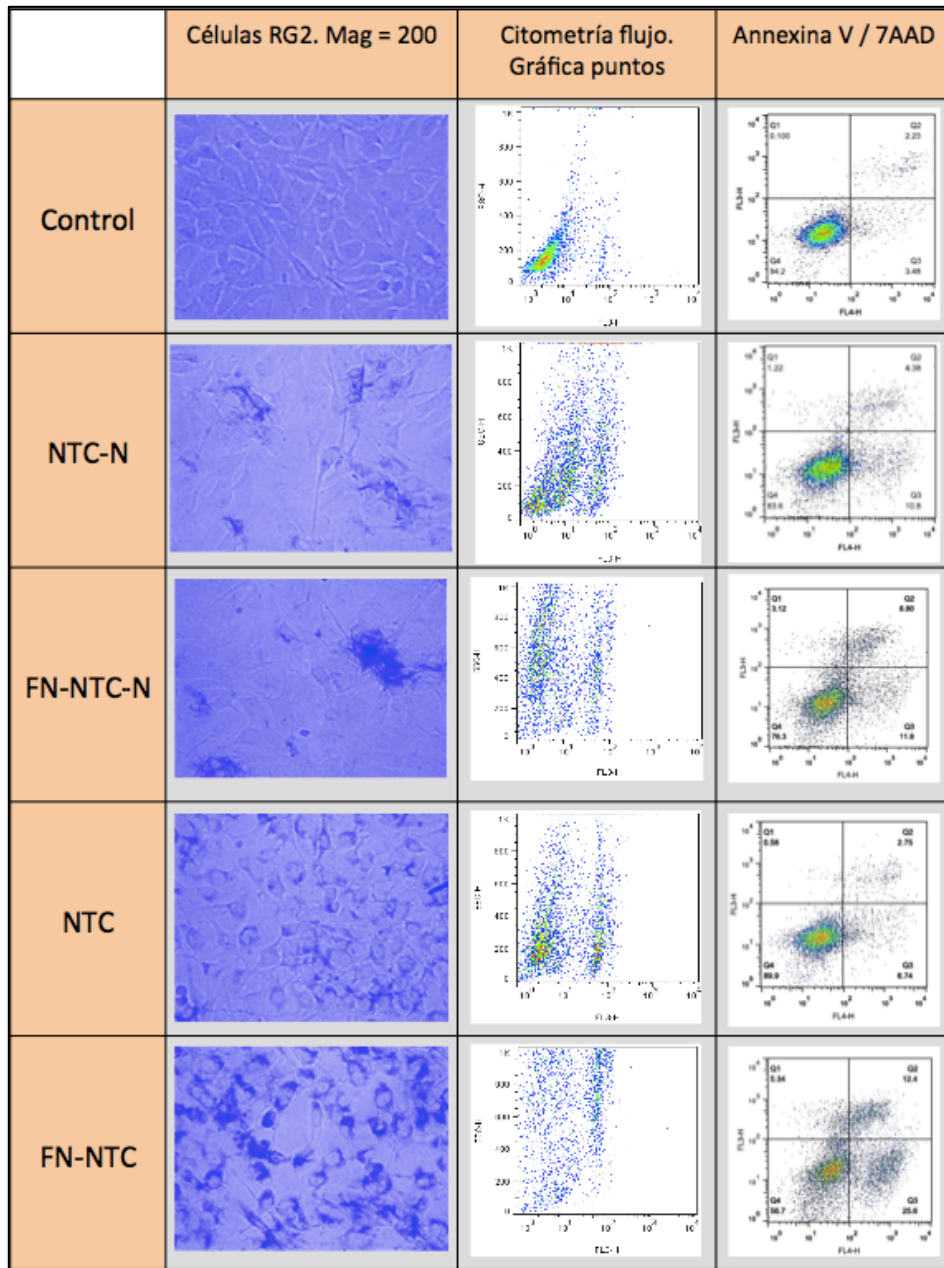


Figura 5a. Imágenes de microscopía óptica (columna izquierda) de los cultivos celulares tratados con los 4 grupos de NTC; se pueden apreciar los NTC mayormente internalizados en las células de los grupos 2 y 4. En la segunda y tercera columna se aprecian las gráficas de puntos de la citometría de flujo sin y con tinción, respectivamente, con Annexina V y 7AAD.

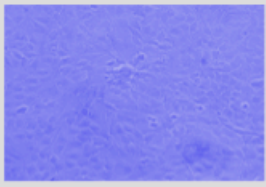
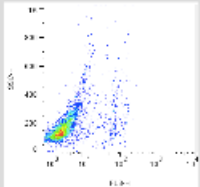
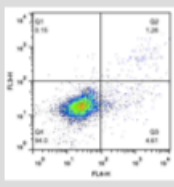
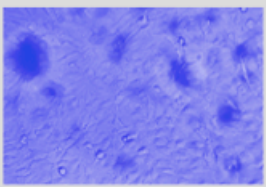
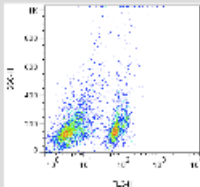
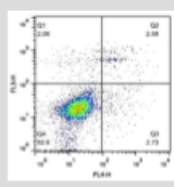
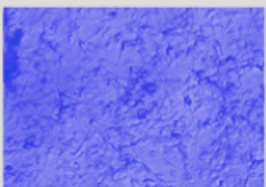
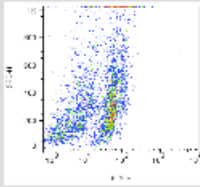
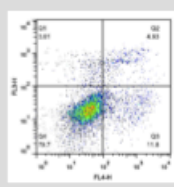
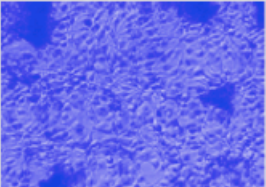
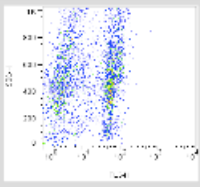
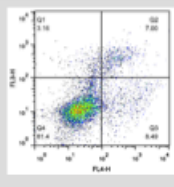
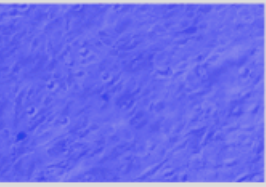
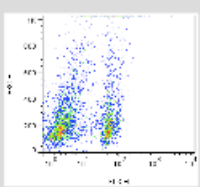
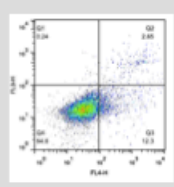
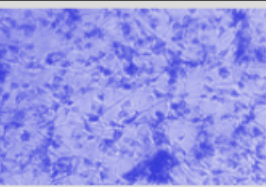
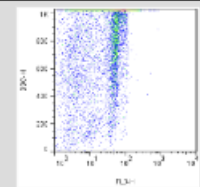
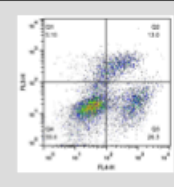
	Células RG2. Mag = 200	Citometría flujo. Gráfica puntos	Annexina V / 7AAD
Control DMSO			
TMZ			
NTC-N + TMZ			
FN-NTC- N + TMZ			
NTC + TMZ			
FN-NTC + TMZ			

Figura 5b. Imágenes de microscopía óptica (columna izquierda) de los cultivos celulares tratados con TMZ y los 4 grupos de NTC + TMZ; se pueden apreciar los NTC mayormente internalizados en las células de los grupos 6 y 8. En la segunda y tercera columna se aprecian las gráficas de puntos de la citometría de flujo sin y con tinción, respectivamente, con Annexina V y 7AAD.

Los NTC inducen apoptosis en las células RG2 de GBM

El efecto inductor de apoptosis de los NTC fue investigado a través de citometría de flujo de las células RG2 teñidas con Annexina V y 7AAD. Los resultados obtenidos de este experimento (Figura 6) muestran que si bien todos los grupos de NTC ocasionaron cierto porcentaje de inducción de apoptosis, el grupo 4 (FN-NTC) fue el que presentó el mayor y único con significancia estadística (>30%, $p < 0.001$), sugiriendo que éste es el principal mecanismo de muerte celular activado por la presencia de NTC. Asimismo al buscar inducción de necrosis encontramos que existe también cierto porcentaje en mucho menor proporción en comparación con apoptosis (hasta 6%, $p < 0.001$) (Figura 7).

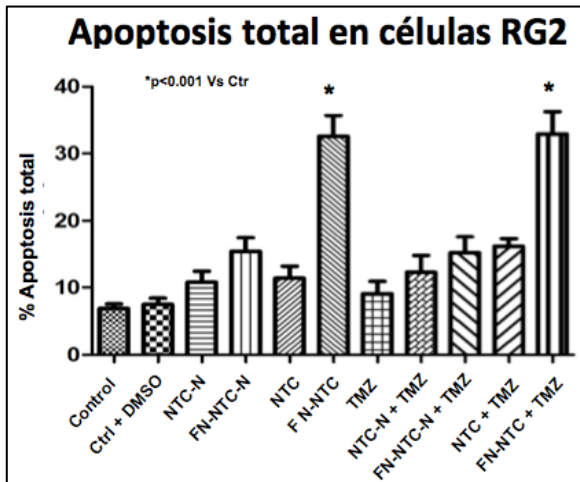


Figura 6. Análisis de porcentaje de inducción de apoptosis total para células RG2 tratadas con los 8 grupos de NTC. Se observa que el grupo 4 presentó inducción de apoptosis >30% ($p < 0.001$)

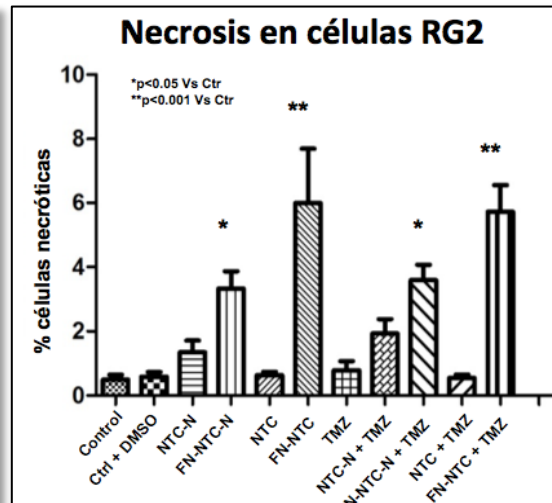
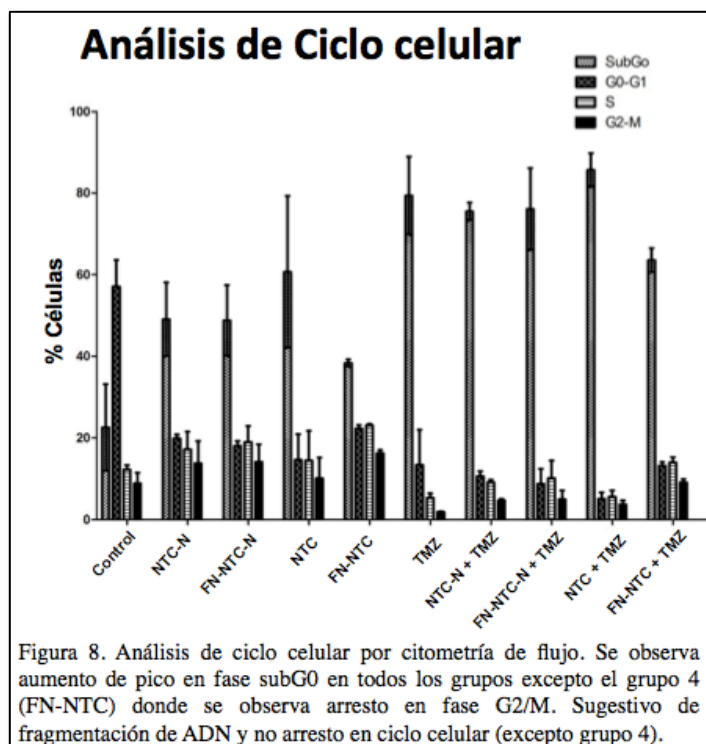


Figura 7. Análisis de porcentaje de inducción de necrosis para células RG2 tratadas con los 8 grupos de NTC. Se observa que grupo 4 presentó inducción de apoptosis >30% ($p < 0.001$)

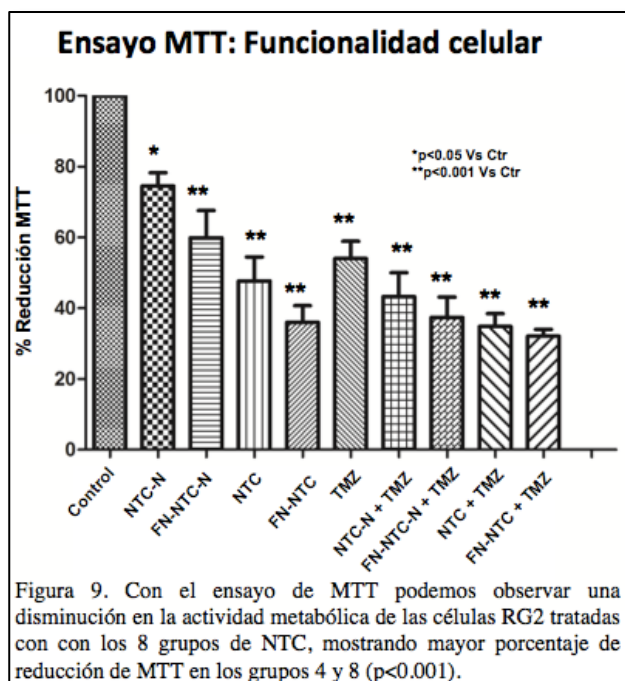
Los NTC inducen fragmentación del ADN aumentando el pico subG0 en las células RG2

A raíz de los resultados del experimento previo, donde se evidenció la inducción de apoptosis por la presencia de NTC resultando en un menor número de células viables, se prosiguió a investigar más a fondo el mecanismo de inhibición de viabilidad celular. Para ello se utilizó citometría de flujo para evaluar el efecto de los NTC sobre el ciclo celular (Figura 8). Al analizar la información obtenida se descubrió que hubo un aumento en el número de células en el pico subG0 and todas las células RG2 tratadas con 50µg/mL de cualquiera de los grupos de NTC. Asimismo se observó una potenciación de este efecto al añadir TMZ (Grupos 5 – 8). Cabe destacar que únicamente en el grupo 4 (FN-NTC) se observó un arresto en la fase G2-M. Estos resultados indican que el principal mecanismo de muerte celular ocasionado por los NTC no es a través del arresto en el ciclo celular sino por fragmentación del ADN, a excepción del grupo 4.



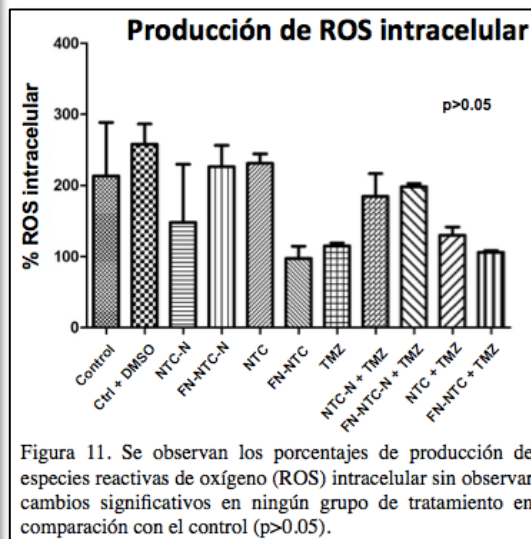
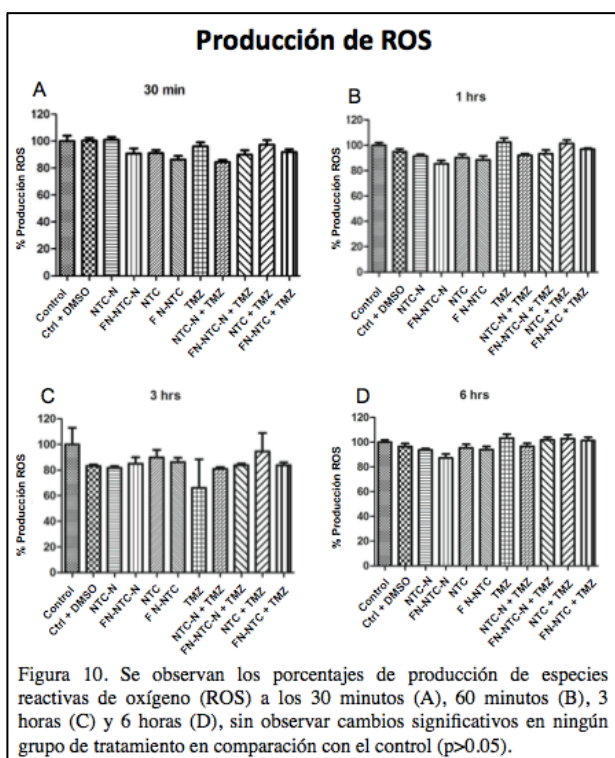
Análisis de funcionalidad celular

Se utilizó un ensayo de MTT para investigar si los NTC inducían disfunción celular (disminución en actividad metabólica). Los resultados obtenidos tras 24 horas de tratamiento mostraron una reducción significativa en todos los grupos celulares tratados con NTC así como en los grupos de NTC + TMZ. La mayor disminución en reducción de MTT fue vista en ambos grupos tratados con FN-NTC (Grupos 4 y 8) como se puede observar en la Figura 9.



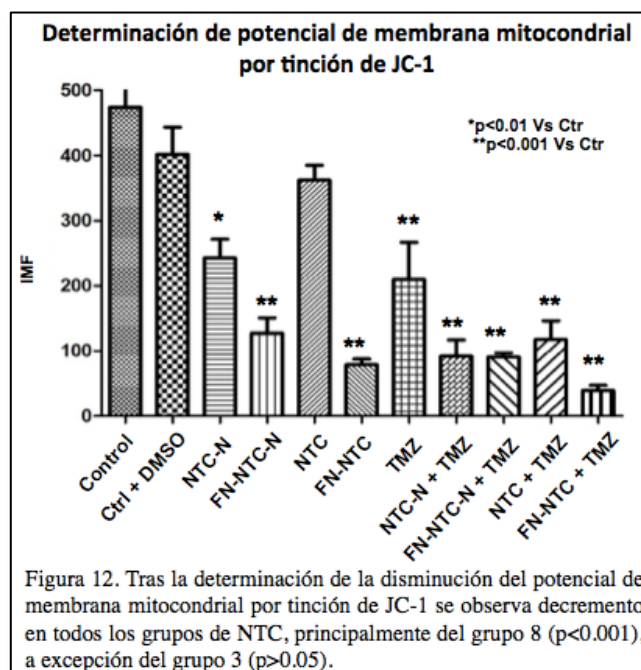
Los NTC no ocasionan estrés oxidativo

Debido a que parte de la composición de los NTC está compuesta por una cierta cantidad de Fe, en teoría es posible que esto conlleve a una producción de ROS a través de la reacción de Fenton, por lo tanto realizamos un análisis en búsqueda de dichos elementos utilizando DCFH-DA en diferentes periodos de tiempo del tratamiento. Los resultados obtenidos no mostraron ningún cambio significativo en la producción de ROS tanto intra como extracelulares (Figuras 10 y 11). Se observó un decremento de las ROS intracelulares en los grupos 4, 8 y en TMZ sola, sin embargo dicho decremento no alcanzó la significancia estadística ($p = 0.80$).



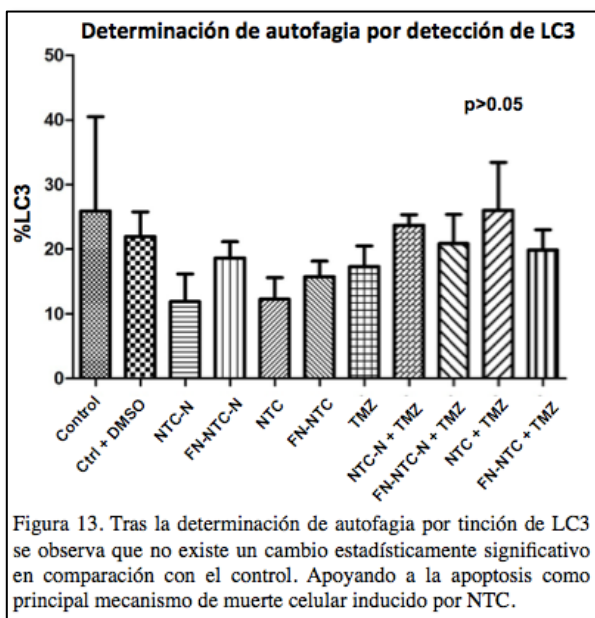
Los NTC inducen apoptosis al ocasionar una reducción en el potencial de membrana mitocondrial

Debido a que los resultados previos mostraron inducción de apoptosis en las células RG2, el siguiente paso fue estudiar la posible reducción en el potencial de membrana mitocondrial inducida por NTC (proceso mitocondrial que lleva a la apoptosis y por lo tanto es un marcador de la misma), para lo cual se realizó el ensayo con JC-1, el cual nos permite teñir de forma adecuada el potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto es posible calcular el gradiente. Los resultados obtenidos mostraron un decremento significativo en el potencial de membrana mitocondrial en todos los grupos tratados con NTC ($p < 0.001$) excepto en el grupo 3 ($p > 0.05$). El mayor efecto fue visto en el grupo 8 (Figura 12).



Los NTC inducen apoptosis pero no autofagia

Como se ha reportado ya en la literatura, existen factores que inducen autofagia y no apoptosis en células cancerígenas, incluyendo a las células malignas de glioma, como es la radiación o agentes quimioterapéuticos tales como el Tamoxifeno, el trióxido de arsénico y la TMZ.⁴⁹ Para el estudio de autofagia en el presente trabajo se expuso a las células RG2 a TMZ sola (100mM), NTC (50µg/mL) y la combinación de NTC + TMZ durante 24 horas. Posteriormente los preparados fueron teñidos con LC3, como se ha descrito previamente en el texto y se analizaron los cambios por citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 13 no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos de tratamiento.



Los NTC no producen inflamación y son endocitados por las células de GBM

Los NTC fueron inyectados tanto en el parénquima cerebral de ratas sanas como dentro del tejido tumoral con el objetivo de observar la distribución de las nanopartículas tanto en tejido sano como en neoplásico (Figura 14). Tras 30 días de vigilancia las ratas sanas fueron sacrificadas y el tejido cerebral fue estudiado. Encontramos que los cuatro tipos de NTC se depositaron en el tejido cerebral sano, sin observar presencia o datos de inflamación, concentrándose en el sitio de la inyección. Asimismo, es importante destacar que ninguno de los animales inyectados intracerebralmente con los diferentes tipos de NTC mostraron signos de toxicidad local o sistémica. Esto se pudo corroborar tras la evaluación hematológica y bioquímica (incluyendo química sanguínea, electrolitos séricos, pruebas de función hepática y renal) donde no se observaron diferencias significativas entre los resultados de ratas inyectadas intracerebralmente y ratas sin inyección como grupo control (Apéndice 1).

Por otro lado, al realizar el estudio de tejido tumoral se observó un menor acúmulo de NTC, particularmente en el caso de los FN-NTC, en los cuales se observó la mayor dispersión de nanopartículas e internalización de éstos por las células tumorales (Figura 14). Estos hallazgos nos traducen que los NTC son mayormente fagocitados por células tumorales que por células gliales sanas, además de mostrar una mayor capacidad de fagocitosis de los NTC funcionalizados que los no funcionalizados, posiblemente debido a que ellos se mantienen más dispersos.

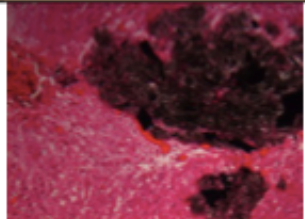
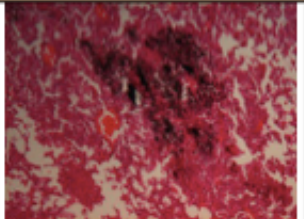
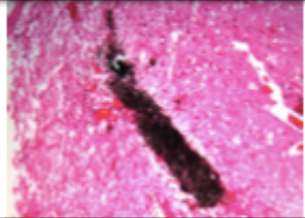
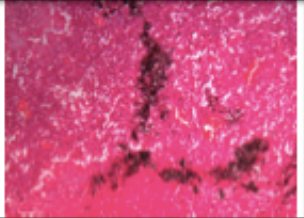
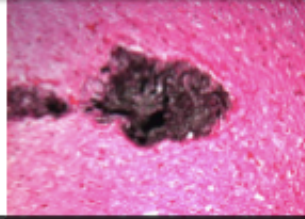
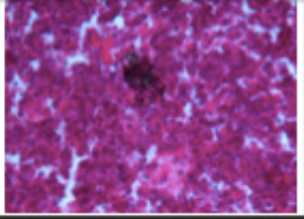
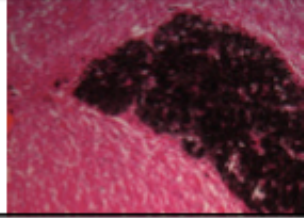
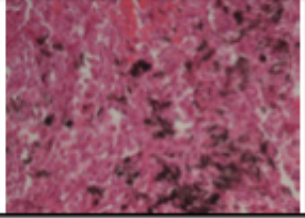
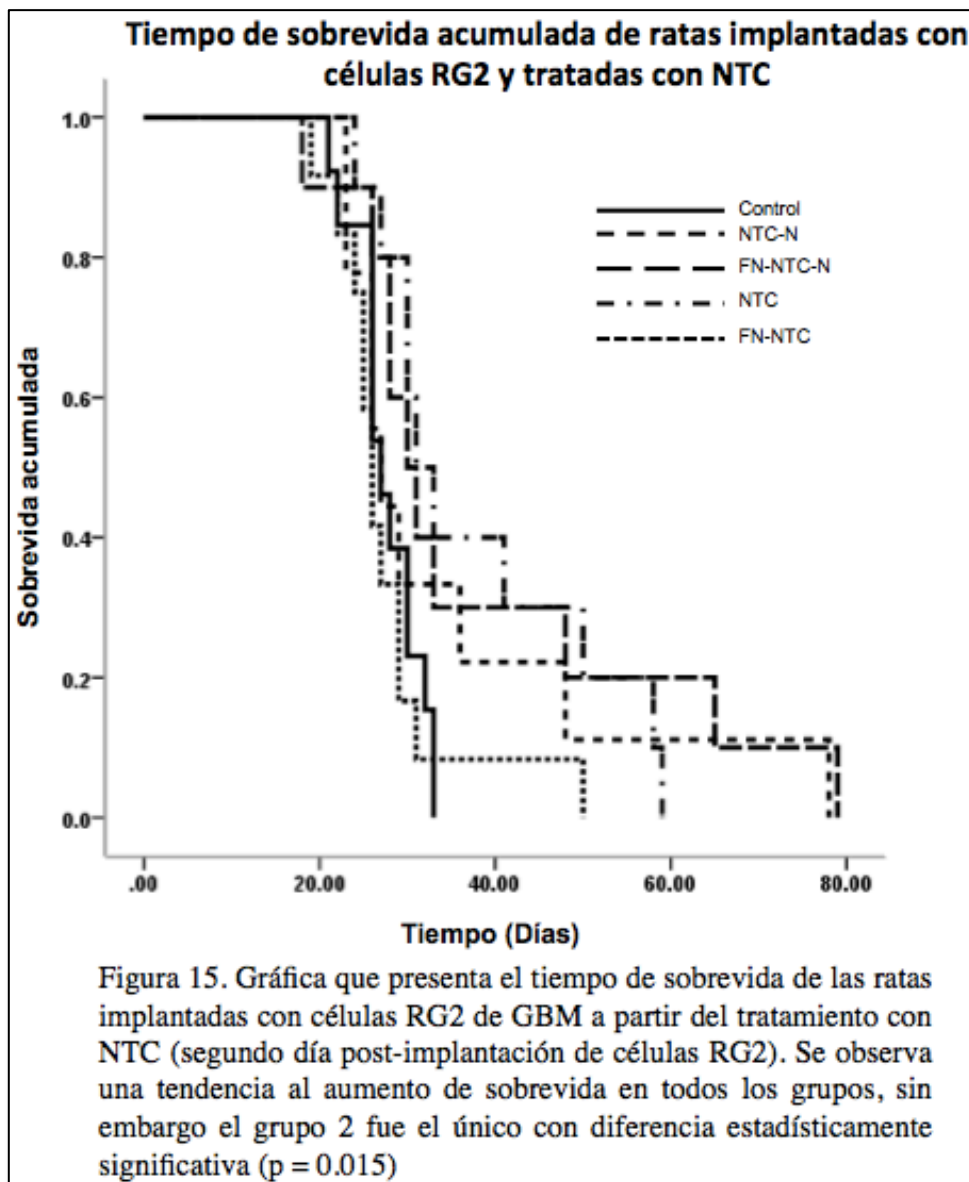
TRATAMIENTO	CEREBRO SANO	TEJIDO TUMORAL
NTC-N		
FN-NTC-N		
NTC		
FN-NTC		

Figura 14. Fotografías de microscopía óptica de cortes histológicos de cerebros de ratas implantadas con NTC y con células RG2 de GBM + NTC. Se observa mayor endocitosis en células malignas que en parénquima sano.

Los FN-NTC-N aumentan la sobrevida de ratas implantadas intracerebralmente con glioma RG2.

Con el objetivo de determinar si los NTC incrementan la sobrevida de ratas implantadas con glioma RG2 intracerebral, determinamos la sobrevida de las mismas al ser inyectadas dos días posteriores al implante; Para cada uno de los grupos de NTC (Grupos 1 – 4) se inyectaron 10 ratas de forma intratumoral como fue descrito previamente en el texto. Al comparar los resultados observamos un incremento en la sobrevida de las ratas en todos los grupos, sin embargo el único con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.015$) fue el grupo de FN-NTC-N (Grupo 2) (Figura 15).



9. DISCUSIÓN

En años recientes los NTC han sido utilizado como agentes transportadores de fármacos además de cómo biosensores analíticos y diagnósticos, entre otras funciones. Sin embargo pueden ser utilizados también como tratamiento para tumores cerebrales debido a que su nanoestructura, morfología y sus propiedades biológicas les confieren la capacidad de atravesar la BHE. Esto incluso ha sido ya publicado previamente en modelos animales donde se observa que los NTC inyectados sistémicamente son posteriormente internalizados en las células del parénquima cerebral vía mecanismos de fagocitosis, alcanzando de esta manera una localización intracitoplasmática tras 24 horas.⁴¹

En el presente estudio determinamos el potencial de inducción de muerte sobre células de glioblastoma de rata de cuatro diferentes tipos de nanotubos de carbono con diferentes características (NTC, NTC funcionalizados y NTC dopados con nitrógeno). El método de preparación utilizando la técnica AACVD permite obtener NTC más uniformes, más limpios y de manera más sencilla, a diferencia de otros métodos de producción, lo que hace que sean atractivos como posibles herramientas terapéuticas.

Los NTC utilizados en este protocolo inducen la muerte celular tanto de astrocitos sanos como de células RG2 desde concentraciones de $10\mu\text{g/mL}$ (Figuras 2 y 3), lo cual es concordante con lo que ha sido reportado por otros autores en la literatura.^{41, 42, 54, 55}

Tras la realización de diferentes concentraciones de NTC decidimos utilizar la concentración de $50\mu\text{g/mL}$ para los estudios posteriores debido a que a dicha concentración se alcanzó el mejor balance entre el efecto citotóxico y la dispersión de los NTC.

Tomando en cuenta que el mejor tratamiento actual para GBM consiste en resección máxima segura seguida de radioterapia (RT) y quimioterapia (QT) con TMZ, como se detalle al inicio del trabajo, decidimos utilizar los cuatro tipos de NTC que sintetizamos previamente en combinación con TMZ con el objetivo de determinar si ello potenciaría la inducción de muerte sobre células de glioblastoma RG2. Al analizar la información

obtenido observamos un incremento al doble en el porcentaje de muerte celular al combinar cualquiera de los cuatro grupos de NTC con TMZ, lo que sugiere que el uso de NTC concomitantemente con el tratamiento estándar al día de hoy es posible, e incluso podría mejorar la expectativa terapéutica en estos pacientes. Este hecho concuerda con lo descrito en la literatura ya que se han publicado trabajos con resultados similares donde utilizaron NTCPS en combinación con TMZ in vivo; en dicha publicación el efecto observado lo atribuyen a la modulación del sistema inmune por la TMZ y la potenciación de este por el recubrimiento de los nanotubos con CpG.³⁸ Cabe destacar que el actual trabajo es el primero reportado que explora el efecto de la combinación de NTC multicapa (NTCPM) con TMZ in vitro sobre células de glioblastoma.

El mecanismo de toxicidad de los NTC aún no se encuentra definido en su totalidad y depende de múltiples factores intrínsecos al material tales como la formulación, capacidad de endocitosis y procedimiento de producción.⁵⁶ Es por ello que nosotros decidimos determinar la biodisponibilidad de estos materiales en células de glioma RG2 y lo que observamos fue que los NTC funcionalizados fueron más eficientemente endocitados por las células RG2 a diferencia de los no funcionalizados, y esto iba en relación a que los primeros se mantenían en un porcentaje mayor de dispersión, manteniendo así sus características nanométricas.

Del análisis FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) en la citometría de flujo aprendimos que las células tratadas con NTC de los grupos 3, 4 y 8 mostraron un aumento en su tamaño en comparación con el grupo control (Figuras 5a y 5b). Esto es posiblemente debido a que la funcionalización permite que una mayor dispersión de los NTC favoreciendo de esta manera su biodisponibilidad (Figura 5a). Posteriormente encontramos que el porcentaje de endocitosis no se vio modificado por la adición de TMZ (Figura 5b).

Algunas de las características de superficie de los NTCPM funcionalizados, tales como el grado de hidrofobia y la modificación de proteínas, son importantes para que se lleven a cabo los pasos necesarios que llevan a su internalización a las células.³² Lo que pudimos

observar en este estudio va en concordancia ya que se evidenció que los NTC funcionalizados y dopados con nitrógeno fueron fagocitados de una manera más eficiente, lo cual se traduce en un aumento en los porcentajes de muerte celular.

Otro punto interesante a analizar es que en nuestro estudio pudimos observar un aumento en la inducción de muerte celular principalmente en las células tratadas con los Grupos 4 y 9 de NTC, evidenciado por un aumento en el número de células positivas a Annexina V (apoptosis total) (Figura 6), una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Figura 12) y una reducción en la funcionalidad celular (Figura 9). Existen varias hipótesis en relación a la inducción de muerte celular por los NTC. Algunas de las más aceptadas sugieren que los NTC inducen la creación de adductos y/o daño a nivel cromosómico o en el ADN. Lindberg et al sugieren que los NTC son muy eficientes al interactuar con biomoléculas ya que estimulan la formación de conjugados no-covalentes (proteína-NTC). Dichos conjugados pueden ser transportados hacia el interior de un gran número de células de mamíferos a través de endocitosis.³⁴ Una vez liberados por los lisosomas estos conjugados son internalizados hacia el citoplasma donde llevan a cabo diferentes funciones biológicas que se hacen evidentes cuando ocurre la inducción de apoptosis por la regulación de la expresión de la familia proteica BCL-2. Al expresarse esta familia de proteínas ocasionan la liberación de citocromo-C de la mitocondria hacia el citosol.⁴²

Los resultados arrojados por el análisis de ciclo celular mostraron un arresto en la fase subG0 en todos los grupos (1 – 8), incluso en un porcentaje discretamente mayor en los grupos con TMZ (5 – 8). El único que mostró un arresto en la fase G2/M fue el Grupo 4 (FN-NTC) (Figura 8). Estos resultados apuntan a que los procesos de muerte celular son mediados principalmente por un aumento en apoptosis y fragmentación del ADN, aunque el grupo 4 mostró arresto en la fase G2/M del ciclo celular. Resultados similares se han publicado previamente en líneas celulares de leucemia donde el tratamiento con NTC indujo una disminución en proliferación celular asociado a arresto en el ciclo celular en la fase G0/G1.⁵⁷ Asimismo existen diversos reportes sobre NTC causando arresto del ciclo celular en diversas fases al estudiar distintos tipos de células.

Existen estudios publicados que sugieren que la presencia de NTC induce formación de ROS, tanto en NTCPM sin dopar así como NTCPM dopados con nitrógeno (NTC-N)⁵⁸, sin embargo otros trabajos reportan lo contrario, encontrando que los NTC no aumentan la producción de ROS sino por el contrario inducen apoptosis.⁵⁷ De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no se pudo evidenciar ningún cambio estadísticamente significativo en la producción de ROS (Figuras 10 y 11). Esta información sugiere que la inducción de apoptosis no es resultado de un aumento en producción de ROS, sino por activación de vías de señalización inductoras de apoptosis como se ha comentado anteriormente en el presente trabajo. Otro posible mecanismo de muerte celular que podría ser activado por los NTC es el de autofagia, sin embargo, como se ha mencionado, en este trabajo los resultados no mostraron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de células que expresan cadena ligera de LC3 (Figura 13).

En los modelos *in vivo* que desarrollamos estudiamos diferentes variables que son importantes para la aplicación clínica de esta metodología. Primeramente con el objetivo de determinar si los NTC producen un efecto tóxico, local o sistémico, llevamos a cabo la inyección de 50 μ g/10 μ l de NTC/PBS en cerebros de ratas sanas y tras 21 días de la inyección tomamos muestras sanguíneas para estudiar los parámetros hematológicos y bioquímicos comentados previamente, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas con los resultados de las ratas del grupo control (Apéndice 1). De igual manera, al realizar cortes histológicos del sitio de inyección de los NTC en el parénquima cerebral de las ratas tratadas, no se observaron datos de inflamación en ninguno de los grupos de NTC. Tampoco se observó difusión de los NTC hacia el tejido cerebral sano adyacente; por el contrario observamos que se formaron acúmulos de los NTC (Figura 14).

En contraste, al realizar los cortes histológicos de los cerebros de ratas implantadas con células RG2 de GBM y NTC, pudimos observar que los NTC se encontraban mayormente dispersos y con una mayor difusión hacia el interior de las células malignas. Esto probablemente sea ocasionado por la mayor capacidad de endocitosis por parte de las células malignas.

Posteriormente, con el objetivo de conocer si los NTC cuentan con la capacidad de inducir la muerte de células tumorales y de incrementar la sobrevida de ratas implantadas con glioblastoma intracerebral, realizamos la inyección intratumoral de los cuatro tipos de NTC (Grupos 1 – 4) que sintetizamos y cuantificamos la sobrevida de las ratas implantadas. Los resultados obtenidos mostraron un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia acumulada de las ratas tratadas con FN-NTC-N (Grupo 2) (27 Vs 38 días, $p=0.015$) en comparación con el grupo control (Figura 15). No pudimos observar un incremento estadísticamente significativo en la sobrevida de las ratas con los 3 grupos restantes de NTC. Sorpresivamente, los FN-NTC (Grupo 4) que *in vitro* mostraron una mayor inducción de muerte de células RG2, no reflejaron un impacto significativo en la sobrevida en el modelo animal. Es posible que esto sea debido a que estas nanopartículas indujeron la muerte tanto de células sanas como tumorales, dada la ausencia de selectividad por células malignas, lo que en el balance general no favorece la sobrevida del animal tratado. Como hemos visto los reportes en la literatura sobre los NTC son aún controversiales y en algunos casos contradictorios. Existen reportes que muestran que los NTC son endocitados por células sanas provocando disfunción lisosomal y daños a nivel mitocondrial tanto en células sanas como neoplásicas, además de tener una potente actividad pro-inflamatoria en macrófagos.⁵⁹ Es posible que este efecto sea explicado debido a que los FN-NTC-N al ser más fácilmente fagocitados por las células neoplásicas disminuyan sus posibles efectos sobre tejido sano, resultando en menor inflamación, mayor citotoxicidad en células malignas y subsecuentemente traduciéndose en un aumento en la sobrevida de las ratas.

10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente trabajo cuenta con un número pequeño tanto de muestras *in vitro* como de número de animales incluidos para el modelo *in vivo*, por lo que es estadísticamente imposible establecer una conclusión y generar una recomendación definitiva con base en la información, y por lo tanto aún no es posible pasar a modelos humanos, sin embargo con los resultados obtenidos se puede determinar que los NTCPM cuentan con actividad citotóxica, que era uno de los objetivos de la presente investigación. Asimismo, gracias a los datos obtenidos es posible justificar la realización de nuevos estudios con un universo mayor y que incluya otro tipo de experimentos que nos permitan acercarnos más al contexto de un paciente real quién bajo el régimen de tratamiento actual recibirá cirugía + radioterapia + quimioterapia.

11. CONCLUSIONES

El uso de la nanotecnología en medicina (nanomedicina) se encuentra en una etapa de desarrollo y se ha diseminado y ampliado su campo de manera rápida en los últimos años debido a los resultados prometedores que se han publicado en diferentes ámbitos de la medicina. Como hemos podido observar las nanopartículas se han ido utilizando para diversos fines dentro del campo de la medicina, ya se como acarreadores de otros componentes (tales como fármacos) o incluso como lo han mostrado los estudios más recientes, como potenciales tratamientos para un número considerable de enfermedades.

En este estudio intentamos adentrarnos hacia el posible uso de los nanotubos de carbono multicapa como una nueva potencial herramienta terapéutica para el GBM. Los resultados que obtuvimos a raíz de los experimentos y ensayos realizados en es trabajo sugieren que los NTCPM por sí mismo, pero aún más adyuvados por la aplicación de TMZ, inducen un aumento en los porcentajes de muerte celular al causar un arresto en el ciclo celular, activando de esta manera mecanismos de apoptosis en las células donde fueron endocitados.

Además de lograr evidenciar que los nanotubos cuentan con efectos citotóxicos sobre las células de glioblastoma, pudimos observar que en el modelo animal donde fueron estudiados, mostraron un perfil de seguridad alto ya que no se pudo observar ningún dato de toxicidad tanto local como sistémica e incluso logrando un aumento estadísticamente significativo en la sobrevivencia de ratas tratadas con un grupo específico de NTC.

A pesar de ser un acercamiento aún en etapas iniciales hacia esta alternativa de tratamiento, los resultados hasta este momento son prometedores. Es de importancia mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo son validados y complementados por lo que se encuentra ya publicado en la literatura, lo cual nos da pie continuar realizando estudios al respecto para lograr comprender de manera más precisa el alcance de esta nueva potencial opción terapéutica. Es de suma importancia comprender y tomar en cuenta a fondo los posibles riesgos/beneficios de aplicar una nueva terapia, por lo que es importante complementar con estudios de seguridad y toxicidad para poder determinar si es posible plantear un estudio en seres humanos.

12. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En cuanto a los temas de ética y bioética que deben ser apreciados y tomados en cuenta en este trabajo es importante aclarar que todos los procedimientos y manejos que involucraron modelos animales fueron llevados a cabo con total apego a las normas y guías institucionales para el manejo de animales de laboratorio.

Por otro lado es importante destacar el hecho que el mal pronóstico de los pacientes con diagnóstico de GBM, aunado a la inexistencia de un tratamiento eficaz para el mismo, presentan una justificación ética para la realización de este estudio y del uso de los recursos necesarios para ello.

13. PERSPECTIVAS

La investigación en el tratamiento contra el GBM ha sido amplia y con muchos enfoques, sin embargo los resultados no han logrado impactar significativamente en la tasa de curación, misma que hasta el día de hoy es nula. Debido a los pobres resultados actuales es fundamental seguir investigando diversas alternativas que permitan mejorar el pronóstico de estos pacientes. Los NTC parecen ser una buena alternativa ya que presentan actividad anti-GBM con efectos tóxicos mínimos. Es necesario ampliar este estudio con un número mayor de sujetos de estudio y un seguimiento más prolongado.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos el día de hoy en el campo de la nanotecnología y en particular en el campo de la nanomedicina es el hecho que aún se desconocen los efectos a largo plazo de las nanopartículas. Aunque comienzan a existir estudios que abordan el tema de seguridad en el manejo de las nanopartículas en relación a los posibles daños a la salud (que podrían ser comparables con los efectos del asbesto en las vías respiratorias)^{56, 58}, aún no se ha podido elucidar de forma certera. Asimismo, en el caso particular de este trabajo cabe mencionar que se realizó aún en una etapa básica de estudio (*in vitro* y modelo animal), por lo que es imposible establecer conclusiones sobre los efectos a largo plazo, aunque al corto plazo aparentemente son seguros, es pertinente que al continuar explorando esta línea de investigación el tema de efectos a largo plazo sea considerado para su estudio.

14. REFERENCIAS

1. Berens ME, Rutka JY, et al. Brain Tumor Epidemiology, Growth and Invasion. *Neurosurg Clin North Am.* 1990;1:1-8.
2. Celis MA, Alegría MA, González A, et al. Primer consenso Mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). Grupo Interdisciplinar Mexicano de Investigación en Neurooncología (GIMINO). *Gac Med Mex.* 2015;151:403-415.
3. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma: a Population-Based Study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-6899.
4. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
5. Weller M, Van Den Bent M, Hopkins K, et al. EANO Guideline for the Diagnosis and Treatment of Anaplastic Gliomas and Glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014;15:e395-403.
6. Louis D, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a Summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803-820.
7. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation Among Pathology, Genotype and Patient Outcomes in Glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(9):846-854.
8. Louis D, Perry A, Burger P, et al. International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain Pathology.* 2014;24:429-435.
9. Scott JN, Brasher PM, Sevick RJ, et al. How Often are Nonenhancing Supratentorial Gliomas Malignant? A Population Study. *Neurology.* 2002;59(6):947-949.
10. Burtcher I, Skagerberg G, Geijer B, et al. Proton MR Spectroscopy and Preoperative Diagnostic Accuracy: An Evaluation of Intracranial Mass Lesions Characterized by Stereotactic Biopsy Findings. *Am J Neuroradiol.* 2000;21(1):84-93.

11. Ryken Ch, Aygun N, Morris J, et al. The Role of Imaging in the Management of Progressive Glioblastoma: A Systematic Review and Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Neurooncol.* 2014;118:435-460.
12. De la Fuente M, Young R, Rubel J, et al. Integration of 2-hydroxyglutarate-proton magnetic resonance spectroscopy into clinical practice for disease monitoring in isocitrate dehydrogenase-mutant glioma. *Neuro Oncol.* 2016;18(2):293-290.
13. Mukundan S, Holder Ch, Olson J. Neuroradiological Assessment of Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Neurooncol.* 2008;89:259-269.
14. Yan JL, Van Der Hoorn A, Larkin T, et al. Extent of Resection of Peritumoral Diffusion Tensor Imaging-Detected Abnormality as a Predictor of Survival in Adult Glioblastoma Patients. *J Neurosurg.* Publicado en línea Abril 8, 2016; DOI 10.3171/2016.1JNS152153.
15. Almeida J, Chaichana K, Quiñones A, et al. The Value of Extent of Resection of Glioblastomas: Clinical Evidence and Current Approach. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15:517-530.
16. Ryken T, Kalkanis S, Buatti J, et al. The Role of Cytoreductive Surgery in the Management of Progressive Glioblastoma. *J Neurooncol.* 2014;118:479-488.
17. Eljamel S. 5-ALA Fluorescence Image Guided Resection of Glioblastoma Multiforme: a Meta-Analysis of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2015;16:10443-10456.
18. Xing W, Shao Ch, Qi Z, et al. The Role of Gliadel Wafers in the Treatment of Newly Diagnosed GBM: a Meta-Analysis. *Drug Design, Development and Therapy.* 2015;9:3341-3348.
19. Stupp R, Mason W, Van Den Bent M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2015;352(10):987-996.
20. Stupp R, Hegi M, Mason W, et al. Effects of Radiotherapy With Concomitant and Adjuvant Temozolomide Versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:459-466.
21. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, et al. Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1527-1535.
22. Roa W, Brasher PM, Bauman G, et al. Abbreviated Course of Radiation Therapy in

- Older Patients With Glioblastoma Multiforme: a Prospective Randomized Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(9):1583-1588.
23. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide Versus Standard 6-Week Radiotherapy Versus Hypofractionated Radiotherapy in Patients Older Than 60 Years With Glioblastoma: the Nordic Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):916-926.
 24. Pérez-Larraya J, Ducray F, Chinot O, et al. Temozolomide in Elderly Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma and Poor Performance Status: An ANOCEF Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3050-3055.
 25. Uto M, Mizowaki T, Ogura K, et al. Feasibility Evaluation of Hypofractionated Radiotherapy With Concurrent Temozolomide in Elderly Patients With Glioblastoma. *Int J Clin Oncol*. 2016;Epub ahead of print. DOI: 10.1007/s10147-016-1014-9.
 26. Chinot O, Wick W, Mason W, et al. Phase III Trial of Bevacizumab Added to Standard Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: Mature Progression-Free Survival and Preliminary Overall Survival Results in AVAGlio. *Neuro-Oncology*. 2012;14(Suppl 6):vi101-105.
 27. Olson J, Nayak L, Ormond D, et al. The Role of Targeted Therapies in the Management of Progressive Glioblastoma: A Systematic Review and Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Neurooncol*. 2014;118:557-599.
 28. Olson J, Nayak L, Ormond D, et al. The Role of Cytotoxic Chemotherapy in the Management of Progressive Glioblastoma: A Systematic Review and Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Neurooncol*. 2014;118:501-555.
 29. Darefsky A, King J, Dubrow R. Adult Glioblastoma Multiforme Survival in the Temozolomide Era: A Population-Based Analysis of Surveillance, Epidemiology and End Results Registries. *Cancer*. 2012;118(8):2163-2172.
 30. Pinto L, Mahler M, Vettore A, et al. Glioblastomas: Correlation Between Oligodendroglial Components, Genetic Abnormalities, and Prognosis. *Virchows Arch*. 2008;452(5):481-490.
 31. Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, et al. Cellular Uptake of Functionalized Carbon Nanotubes is Independent of Functional Group and Cell Type. *Nat*

- Nanotechnol. 2007;2(2):108-113.
32. Nimmagadda A, Thurston K, Mollert MU, et al. Chemical Modification of SWNT Alters *in Vitro* Cell-SWNT Interactions. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(3):614-625.
 33. Jia G, Wang H, Yan L, et al. Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. *Environ Sci Technol*. 2005;39(5):1378-1383.
 34. Lindberg HK, Falck GC, Suhonen S, et al. Genotoxicity of Nanomaterials: DNA Damage and Micronuclei Induced by Carbon Nanotubes and Graphite Nanofibres in Human Bronchial Epithelial Cells *in Vitro*. *Toxicol Lett*. 2009;186(3):166-173.
 35. Lu YJ, Wei KC, Ma CC, et al. Dual Targeted Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells Using Folate-Conjugated Magnetic Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;89:1-9.
 36. Moore Th, Grimes S, Lewis R, et al. Multilayered Polymer Coated Carbon Nanotubes to Deliver Dasatinib. *Mol Pharm*. 2014;11(1):276-282.
 37. Santos T, Fang X, Chen M, et al. Sequential Administration of Carbon Nanotubes and near-infrared Radiation for the Treatment of Gliomas. *Front Oncol*. 2014;4(180):1-8.
 38. Ouyang M, White EE, Ren H, et al. Metronomic Doses of Temozolomide Enhance the Efficacy of Carbon Nanotube CpG Immunotherapy in an Invasive Glioma Model. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148139.
 39. Kafa H, Wang JT, Rubio N, et al. Translocation of LRP1 Targeted Carbon Nanotubes of Different Diameters Across the Blood-Brain Barrier *in vitro* and *in vivo*. *J Control Release*. 2016;225:217-229.
 40. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, et al. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect*. 2005;113(11):1555-1560.
 41. Yang Z, Zhang Y, Yang Y, et al. Pharmacological and Toxicological Target Organelles and Safe Use of Single-Walled Carbon Nanotubes as Drug Carriers in Treating Alzheimer Disease. *Nanomedicine*. 2010;6(3):427-441.

42. Ye S, Jiang Y, Zhang H, et al. Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Apoptosis in RAW 264.7 Cell-Derived Osteoclasts Through Mitochondria-Mediated Death Pathway. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;12(3):2101-2112.
43. Seoane M, Iglesias P, González T, et al. Retinoblastoma Loss Modulates DNA Damage Response Favoring Tumor Progression. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3632. DOI: 10.1371/journal.pone.0003632.
44. Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, et al. Phases of Apoptosis of Melanoma Cells, But Not of Normal Melanocytes, Differently Affect Maturation of Myeloid Dendritic Cells. *Cancer Res*. 2001;61(22):8218-8226.
45. Zemruski NC, Stache V, Haefeli WE, et al. 7-Aminoactinomycin D for Apoptosis Staining in Flow Cytometry. *Anal Biochem*. 2012;429(1):79-81.
46. Abarca E, Muñoz S, Moreno M, et al. Re-Organization of Mitochondria at the NK Cell Immune Synapse. *Immunology Letters*. 2009;122(1):18-25.
47. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, is Localized in Autophagosome Membranes After Processing. *EMBO J*. 2000;19(21):5720-5728.
48. Munafó DB, Colombo MI. A Novel Assay to Study Autophagy: Regulation of Autophagosome Vacuole Size by Amino Acid Deprivation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt20):3619-3629.
49. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer Res*. 2003;63(9):2103-2108.
50. Paglin S, Hollister T, Delohery T, et al. A Novel Response of Cancer Cells to Radiation Involves Autophagy and Formation of Acidic Vesicles. *Cancer Res*. 2001;61(2):439-444.
51. Herrera N, Sitges M. Mechanisms Underlying Striatal Vulnerability to 3-Nitropropionic Acid. *J Neurochem*. 2010;114:597-605.
52. Ali S, LeBel C, Bondy S. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. *Neurotoxicol*. 1992;13:637-648.
53. Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, et al. An Improved Rat Brain-Tumor Model. *J Neurosurg*. 1980;53(6):808-815.

54. Holt BD, Short PA, Rape AD, et al. Carbon Nanotubes Reorganize Actin Structures in Cells and Ex Vivo. *ACS Nano*. 2010;4(8):4872-4878.
55. Shams H, Holt BD, Mahboobi Sh, et al. Actin Reorganization Through Dynamic Interactions With Single-Wall Carbon Nanotubes. *ACS Nano*. 2014;8(1):188-197.
56. Aschberger K, Johnston HJ, Stone V, et al. Review of Carbon Nanotubes Toxicity and Exposure – Appraisal of Human Health Risk Assessment Based on Open Literature. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(9):759–790.
57. Dinicola S, Masiello MG, Proietti S, et al. Multiwalled Carbon Nanotube Buckypaper Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Leukemia Cell Lines Through Modulation of AKT and MAPK Signaling Pathways. *Toxicol in Vitro*. 2015;29(7):1298-1308.
58. Mihalchik AL, Ding W, Porter DW, et al. Effects of Nitrogen-Doped Multi-Walled Carbon Nanotubes Compared to Pristine Multi-Walled Carbon Nanotubes on Human Small Airway Epithelial Cells. *Toxicology*. 2015;333:25-36.
59. Boyles MS, Young L, Brown DM, et al. Multi-Walled Carbon Nanotube Induced Frustrated Phagocytosis, Cytotoxicity and Pro-Inflammatory Conditions in Macrophages are Length Dependent and Greater Than That of Asbestos. *Toxicol in Vitro*. 2015;29(7):1513-1528.
60. López MA, Sotelo J. Brain Tumors in Mexico: Characteristics and Prognosis of Glioblastoma. *Surg Neurol*. 2000;53(2):157-162.

15. APÉNDICES

Apéndice 1. (Tabla 1) Resultados de laboratorio de ratas control

Tabla 1. Resultados de pruebas sanguíneas de ratas control (sin tratamiento y sin implante de células RG2)				
Química Sanguínea 4	Unidad	Referencia	R4 - Grupo Ctr	R12 - Grupo Ctr
Glucosa	mg/dL	65.00-110.00	211.43	188.55
Urea	mg/dL	14.00-40.00	49.52	37.23
Creatinina	mg/dL	0.60-1.10	0.56	0.67
Nitrógeno Ureico	mg/dL	6.00-20.00	23	17
Ácido Úrico	mg/dL	3.40-7.00	2.4	2.57
Electrolitos Séricos 6				
Calcio	mg/dL	8.60-10.20	10	10
Fosforo	mg/dL	2.70-4.50	6.22	8.83
Magnesio	mg/dL	1.70-2.55	3	2.75
Sodio	mmol/L	136.00-145.00	142	148
Potasio	mmol/L	3.50-4.50	5.62	4.54
Cloro	mmol/L	98.00-107.00	97.4	100
Funcionamiento Hepático Completo				
Fosfatasa Alcalina	UI/L	32.00-92.00	185.08	111.91
Bilirrubina Total	mg/dL	0.20-1.00	0.06	0.1
Bilirrubina Directa	mg/dL	0.00-0.20	0.03	0.01
Bilirrubina Indirecta	mg/dL	0.00-0.80	0.03	0.09
Transaminasa Glutámico	UI/L	10.00-42.00	279.41	196.56
Transaminasa Glutámico Piruvica	UI/L	10.00-40.00	68.28	103.69
Gamma Glutamil Transferasa	UI/L	8.00-37.00	2.79	2.04
Proteínas Totales	g/dL	6.40-8.30	6	7.03
Albumina	g/dL	3.90-5.10	3.48	3.61
Globulina	g/dL	2.90-3.30	2.52	3.42
Relación A/G		1.50-2.10	1.38	1.06