



Aplicaciones médicas de los **NANOTUBOS DE CARBÓN**

Nanovacunas, administración de fármacos y terapias génicas

SILVIA LORENA MONTES FONSECA

Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Autónoma de Chihuahua

Los nanotubos de carbón (NTC) se han catalogado como uno de los avances tecnológicos más prometedores para el área médica, ya que gracias a su tamaño pequeño pueden transitar libremente a través de la circulación sanguínea e introducirse en compartimentos celulares. También tienen la ventaja de que por medio de reacciones químicas sencillas se pueden pegar a la superficie de los NTC sustancias de interés clínico y facilitar el transporte de estas sustancias a un lugar específico. Incluso estas nanopartículas pueden ser utilizadas para transferir DNA a una célula con una eficiencia mayor que otros métodos convencionales como la electroporación o la microinyección. El objetivo de la presente revisión es describir de una manera sencilla como es que a través de la funcionalización, el NTC puede ser utilizado para la invención de nuevas va-

cunas, para la administración efectiva de drogas y en revolucionarias terapias génicas.



Aarón PINA MORA.

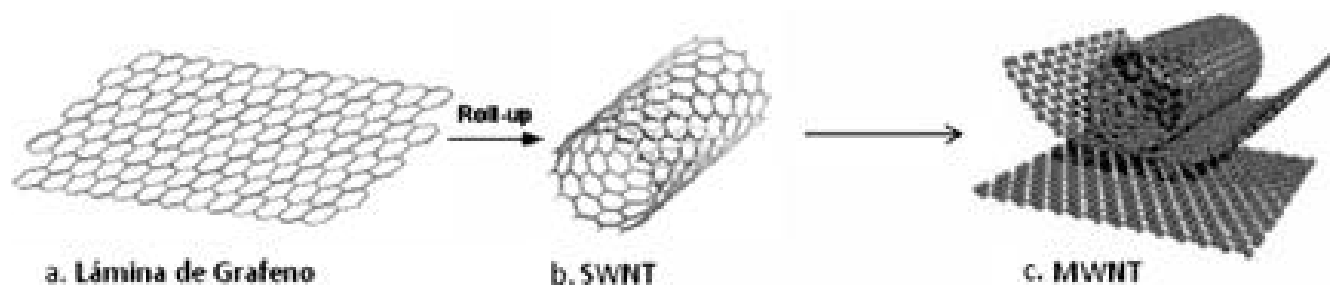


Figura 1. Estructura de los nanotubos de carbono.

¿Qué son los nanotubos?

Un NTC es una nanopartícula cilíndrica compuesta por una o varias capas de grafeno enrolladas,¹ las cuales están formadas por múltiples anillos de átomos de carbono perfectamente estructurados (figura 1a).² Su tamaño varía desde un diámetro de unos pocos nanómetros y puede medir varios milímetros de largo. Los enlaces químicos que unen a los átomos de carbono en los NTC son uniones sp^2 , similares a las del grafito, y bajo altas presiones los NTC pueden fusionarse modificando algunos enlaces a tipo sp^3 confiriéndole fuerza y longitud ilimitada. Las láminas de grafeno de los NTC se atraen entre ellas mismas mediante fuerzas de van de Waals, de tal manera que los NTC tienden a entrelazarse como una trenza de cabello.

De acuerdo con la estructura de su pared, los NTC se clasifican en nanotubos de pared sencilla (SWNT; del inglés *single-walled carbon nanotubes*) y nanotubos de pared compuesta (MWNT; del inglés *multi-walled carbon nanotubes*). La estructura de los SWNT (figura 1b) puede ser conceptualizada por la envoltura de un solo átomo con una capa gruesa de grafito, dentro de un cilindro sin costura. Estos han sido los mejores candidatos para la miniaturización electrónica, debido a sus propiedades eléctricas. Se ha demostrado que después de una excitación con luz visible florecen a una longitud de onda cercana a la infrarroja (entre 900 y 1600 nm).^{3,4} Los MWNT (figura 1c) están formados por múltiples capas de grafeno enrolladas sobre ellas mismas formando un tubo⁵ y la única ventaja que presentan sobre los SWNT es que son más fáciles de sintetizar.

Funcionalización de los NTC

La manipulación de los NTC ha sido limitada debido a que son insolubles en la mayoría de los solventes comunes.⁶ En cambio, la funcionalización orgánica de los NTC ha permitido un alto nivel de solubilidad en cloroformo, diclorometano, acetona, metanol, etanol e incluso en agua.⁷

La funcionalización de los nanotubos se basa en una reacción de cicloadición 1,3-bipolar con intermediarios cargados de azometina, generada por la condensación entre un ácido α -amino y un aldehído (figura 2). Esta interacción fue corroborada al comprobar, mediante microscopía de fuerza atómica, que los compuestos con un extremo amino favorecían la transferencia de cargas hacia el NTC desviando su neutralidad y esto aumenta la fuerza de adhesión.⁸ También se determinaron dos tipos de interacciones, una en la cual el grupo $-NH_2$ a través de un solo par electrónico originaba una polarización positiva sobre el NTC,

lo cual genera una fuerza atractiva entre las cargas negativas del par electrónico y las positivas del nanotubo. Una situación opuesta ocurre cuando la interacción del $-NH_2$ ocurre a través de un átomo de H, el cual tiene una carga parcialmente positiva.

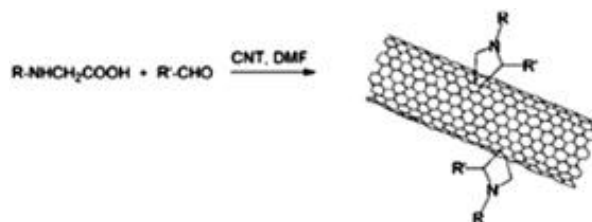


Figura 2. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar con intermediarios cargados de azometina entre un α -aminoácido y un aldehído.

Interacción de los NTC en sistemas biológicos

La solubilidad no fue el único beneficio obtenido de la funcionalización de los NTC. Solo bastó poco tiempo para descubrir que a los grupos funcionales pegados en la pared de los NTC se pueden conjugar una gran variedad de moléculas de interés clínico. Actualmente, hay varias investigaciones que evalúan el comportamiento de los NTC funcionalizados (f -NTC) en diferentes sistemas biológicos que se enfocan principalmente en analizar su capacidad de penetrar distintos tipos de células.⁹

En una investigación realizada por Kostarelos y colaboradores, el grupo funcional amino fue conjugado con diferentes tipos de moléculas, entre las cuales había sondas fluorescentes, antibióticos e incluso proteínas. En este estudio se demostró que los f -NTC, independientemente del grupo funcional, son internalizados por todas las células probadas. También observaron como los f -NTC atravesaron la membrana plasmática celular para alcanzar la región perinuclear después de dos horas de incubación (figura 3).¹⁰

Hay ciertos parámetros que son críticos en cualquier estudio farmacológico, como la vida media en circulación sanguínea, la forma excreción, la distribución y la acumulación en diferentes órganos. Estos datos son importantes al momento de proponer un nuevo sistema terapéuti-

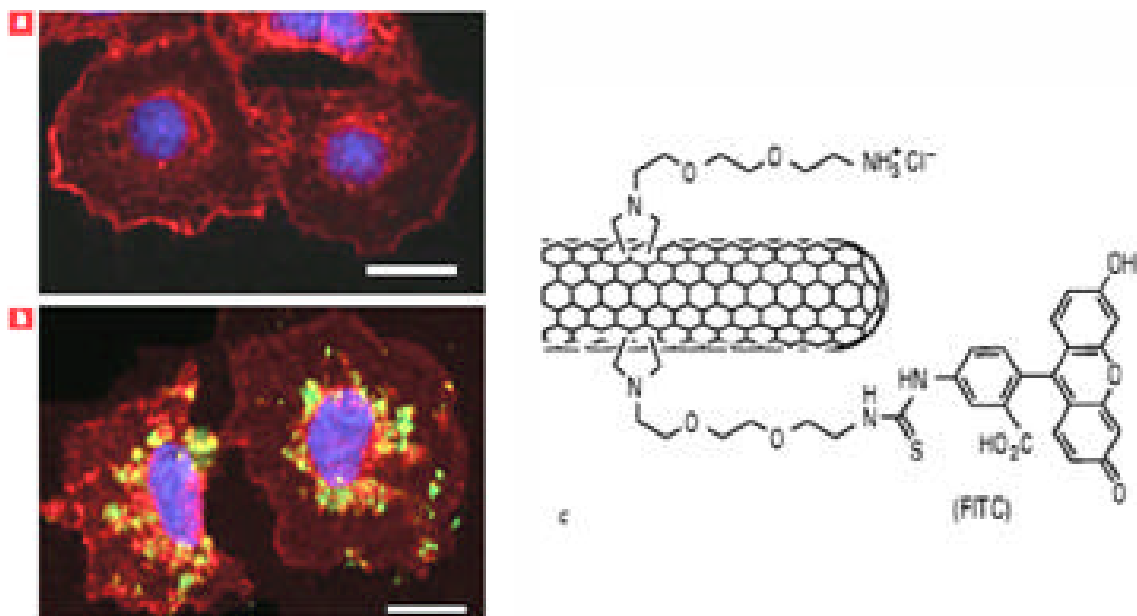


Figura 3. Internalización de CNT funcionalizados. *a* y *b* muestran una imagen confocal de células A549 incubadas dos horas en *a*) ausencia (control) y *b*) con 25 µg del *f*-NTC. *c*) La membrana plasmática fue teñida con WGA-TRITC (rojo) y el núcleo con TO-PRO3 (azul). El *f*-NTC se detecta mediante fluorescencia de color verde (Kostarelos y cols., 2006).

co, independientemente de la naturaleza del mismo.¹¹ Por esta razón, Singh y colaboradores diseñaron un análisis farmacocinético en el cual utilizaron *f*-SWNT con un grupo amonio marcados con un complejo fluorescente de [¹¹¹In] y pentaacetato de dietilenotriamina (DTPA).¹² En sus resultados ellos observaron que los *f*-SWNT inyectados por vía intravenosa en ratones BALB/c tienen una vida media de 3.5 horas en circulación sanguínea y son excretados por la orina sin ser retenidos por algún órgano del sistema retículo endotelial. Estos resultados, aunados a la capacidad de los NTC para atravesar la membrana plasmática e introducirse en cualquier célula, colocan a los NTC como candidatos valiosos para futuras aplicaciones terapéuticas.

Toxicidad

Otro parámetro importante en el área médica es la toxicidad de los NTC dentro de los sistemas biológicos. Ya se han realizado más de 50 estudios enfocados en los efectos de los NTC en la salud humana y el medio ambiente. De acuerdo con una revisión realizada por Helland y colaboradores en el 2007, los efectos de los NTC dependen de las modificaciones físicas y químicas que se les hayan realizado, así como la manera en cómo estos fueron obtenidos. Durante la síntesis de los NTC se utilizan diversos catalizadores como el níquel y el hierro, los cuales pueden quedar retenidos en sus paredes y aumentar su toxicidad. Un tratamiento posterior puede modificar el tamaño, la pureza, el grado de agregación, la estructura de la pared y la funcionalización de la superficie de los NTC. Todas estas alteraciones determinan la toxicidad de la partícula. En el medio ambiente, los NTC han sido considerados como agentes transportadores de contaminan-

tes al adherirse a su superficie, metales, contaminantes orgánicos, fluoruros e hidrocarburos aromáticos. Debido a su naturaleza lipofílica, los NTC pueden ser acumulados en las raíces de las plantas, entrando así en la cadena alimenticia.

En cuanto a los riesgos a la salud, diversos estudios han relacionado a los MWCNT con enfermedad cardiopulmonar, al producir granulomas, reacción inflamatoria y fibrosis. Los SWCNT pueden originar inflamación, daño celular y granulomas multifocales cuando su vía de entrada es intratraqueal ya que son tomados por los macrófagos en vez de ser distribuidos sobre el espacio alveolar. Cuando la vía de entrada de los SWNT es por inhalación, estos son clarificados sin daño alguno; adicionalmente no se ha encontrado ningún efecto de toxicidad en la piel.¹³

Estudios realizados en fibroblastos humanos, demostraron que la exposición a NTC sin funcionalizar aumenta la apoptosis¹⁴ celular, así como una diferencia en la expresión de genes involucrados en una elevada respuesta inmune e inflamatoria.¹⁵

A pesar de todas estas evidencias, existen estudios donde los *f*-NTC no muestran ningún efecto tóxico, como el de Singh y colaboradores mencionado anteriormente, donde los *f*-NTC son clarificados en 3.5 horas de la circulación sanguínea. Bianco y colaboradores en el 2004 determinaron que en las investigaciones donde utilizaron NTC sin funcionalizar se observó un mayor daño citotóxico. Esto se debe a que los NTC en su forma cruda contienen residuos metálicos tóxicos y son insolubles. En cambio, en las investigaciones donde se usaron *f*-NTC no hubo ningún efecto tóxico debido a que todos los residuos metálicos habían sido sustituidos por grupos funcionales y eran altamente solubles.¹⁶

Aplicaciones de los nanotubos en medicina

Actualmente, a los NTC se les ha involucrado en varias investigaciones debido a su capacidad de ser funcionalizados, uniendo a su superficie ligandos de interés médico para utilizarlos como biosensores, marcadores fluorescentes a escala molecular, sondas y acarreadores. Además, por su tamaño, pueden transitar libremente a través de la circulación sanguínea y atravesar la barrera encefálica, el epitelio estomacal y pueden ser filtrados por el bazo y el riñón, convirtiéndose en una gran alternativa para el área terapéutica. A continuación se mencionarán algunas de las aplicaciones donde se han obtenido resultados prometedores en el área médica.

Nanovacunas

Hoy se cuenta con un alto repertorio de vacunas que nos proveen de inmunidad para varias enfermedades; sin embargo, muchas de estas utilizan proteínas de poca biodistribución y no producen una respuesta inmune efectiva. En los últimos años se han desarrollado nuevas vacunas que utilizan nanopartículas como transportadores de moléculas antigénicas a fin de mejorar su biodistribución. Por otro lado, el tamaño de un NTC se puede comparar con un virus y es capaz de producir una respuesta inmune específica contra microorganismos intracelulares.¹⁷

Los NTC pueden ser considerados como transportadores ideales de péptidos antigénicos, por lo que se ha generado gran interés por estudiar sus propiedades inmunogénicas.¹⁸ Pantarotto y colaboradores en el 2003 funcionalizaron CNT con un péptido del virus de la fiebre aftosa (FMDV) y demostraron que el péptido funcionalizado no pierde su capacidad antigénica, por que conserva sus características estructurales. También se evaluó la capacidad inmunogénica del *f*-NTC con el péptido en un sistema experimental murino. Sorprendentemente, la producción de anticuerpos fue mayor en los ratones inmunizados con los *f*-NTC con el péptido, en relación con los niveles encontrados en los ratones inmunizados únicamente con el péptido.¹⁹

Un dato importante es que no se encontraron anticuerpos contra el NTC desnudo. Esto sugiere que no existe una respuesta cruzada entre el NTC y el péptido, lo cual suele presentarse cuando se utilizan proteínas como vectores. Estos resultados ubican a los NTC como uno de los candidatos ideales en cuanto a la fabricación de vacunas.

Administración de drogas terapéuticas

Algunos problemas asociados con la administración de drogas terapéuticas se deben a que estas presentan farmacocinéticas desfavorables debido a su solubilidad y biodistribución limitada, su ausencia de selectividad y el daño que producen a los tejidos. Todos estos problemas pueden ser eliminados al implementar un sistema específico que dirija la droga al lugar deseado. Los NTC son considerados como excelentes transportadores, ya que pueden cruzar la membrana plasmática y distribuirse en los diferentes compartimentos celulares.²⁰

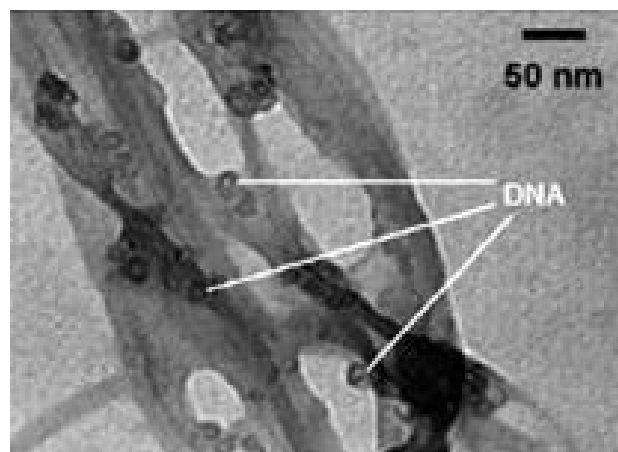


Figura 4. Complejo entre DNA y *f*-NTC. (Bianco y cols., 2004).

El desarrollo de NTC funcionalizados con drogas (antibióticos, antivirales y drogas contra el cáncer) pueden ser dirigidos hacia una población celular específica sin consecuencias colaterales; esto, mediante el uso de motivos activos de reconocimiento presentes simultáneamente en el *f*-NTC.²¹ En un estudio realizado por Pastorini y colaboradores se utilizaron *f*-NTC con isotiocianato de fluoresceína (FITC, marcador fluorescente) y metotrexato (MTX); este último una droga ampliamente utilizada en el tratamiento contra el cáncer. Los *f*-NTC fueron administrados en cultivos de células Jurkat en los cuales se observó una rápida internalización. Asimismo, se encontró una amplia distribución de la señal fluorescente alrededor de la membrana nuclear, lo cual es muy favorable para una acción efectiva de la droga.²²

Terapia génica

La terapia génica ha sido muy prometedora en cuanto al tratamiento de una gran variedad de enfermedades como el cáncer y desórdenes genéticos. La naturaleza catiónica de los *f*-NTC es suficiente para formar complejos con fragmentos de DNA.²³ Además, se demostró que los SWCNT tienen una gran afinidad por las cadenas sencillas de DNA y que mediante interacciones hidrofóbicas es posible funcionalizar covalentemente los NTC con el DNA.

En cuanto al estudio de los NTC como vectores de transferencia de genes, Bianco y colaboradores en el 2004 unieron mediante interacciones electroestáticas plásmidos pCMV- β gal, los cuales expresan una proteína β -galactosidasa, con NTC previamente funcionalizados obteniendo los complejos mostrados en la figura 4. Al utilizar estos complejos para la transferencia de genes se obtuvo una expresión de la β -galactosidasa 5 a 10 veces mayor comparado con la transfección del plásmido únicamente.²⁴

Finalmente, se puede concluir que la principal ventaja que ofrecen los NTC es su capacidad de transportar moléculas hacia cualquier espacio intracelular de una manera específica, por lo que los NTC constituyen una tecnología emergente con un gran potencial de aplicación en el área

médica para direccionar la administración de drogas en terapia génica y en la producción de vacunas. Sin embargo y a pesar de que los NTC han tenido buenos resultados tanto en cultivos celulares como en animales de laboratorio, surgen las preguntas: ¿tendrán los NTC los mismos resultados al ser utilizados en humanos?; ¿no podrán tener un efecto tóxico a largo plazo o a dosis repetidas?; ¿tendrán los mismos efectos si son administrados por vía oral ya que se tiene evidencia de su absorción gastrointestinal? Todas estas preguntas nos demuestran que aún falta mucho por investigar en el caso de que se quiera ampliar el uso de NTC a aplicaciones médicas en pruebas clínicas.

Bibliografía

- BACHILLO, S.M.; M.S. STRANO; C. KITTRELL; R.H. HAUGE; R.E. SMALLEY y R.B. WEISMAN: "Structure-assigned optical spectra of single-walled carbon nanotubes", *Science*, 298 (2002), pp. 2361-66.
- BAHR, J.L. y J.M. TOUR: "Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds", *Chem. Mater.*, 13, 11 (2001), pp. 3823-3824.
- BIANCO, A.; K. KOSTARELOS; C.D. PARTIDOS y M. PRATO: "Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes", *ChemComm.*, (2004), pp. 571-577.
- DING, L.; J. STILWELL; T. ZHANG; O. ELBOUDWAREI; H. JIANG; J. SELEGUE; P. COOKE; J. GRAY y F. CHEN: "Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast", *American Chemical Society*, 5, 12 (2005), pp. 2448-2464.
- FITIS, T.; A. GAMBERELLIS; B. CRIMEEN-IRWIN; G.A. PIETERSZ; J. LI; P.L. MOTTRAM; F.C. MCKENZIE y M. PLEBANSKI: "Size-dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumor", *Journal of Immunology*, 173 (2004), pp. 3148-3154.
- FLAHAUT, E.; R. BACSA; A. PEIGNEY y C. LAURENT: "Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes", *Chemical Communications*, 12 (2003), pp. 1442-1443.
- FRIDDLE, R.W.; M.C. LEMIEUX; G. CICERO; A.B. ARTYUKHIN; V.V. TSUKRUK; J.C. GROSSMAN; G. GALLI y A.A. NOY: "Single functional group interactions with individual carbon nanotubes", *Nature nanotechnology*, 2, 11 (2007), pp. 692-697.
- GEORGAKILAS, V.; K. KONSTANTINOS; M. PRATO; D.M. GULDI; M. HOLZINGER y A. HIRSCH: "Organic Functionalization of Carbon Nanotubes", *JACS communications*, 124, 5 (2001), pp. 760-761.
- HELLAND, A.; P. WICK; A. KOEHLER; K. SCHMID y C. SOM: "Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes", *Environmental Health Perspectives*, 115, 8 (2007), pp. 1125-1131.
- HIRSCH, A.: "Functionalization of single-walled carbon nanotubes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002), pp. 1853-1859.
- KOSTARELOS, K.: "Establishing nanomedicine", *Nanomedicine*, 1, 3 (2006), pp. 259-60.
- KOSTARELOS, K.; L. LACERDA; G. PASTORIN; W. WU; S. WIECKOWSKI; J. LUANGSIVILAY; S. GODEFROY; D. PANTAROTTO; J.P. BRIAND; S. MULLER; M. PRATO y A.A. BIANCO: "Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type", *Nature Nanotechnology*, 2 (2007), pp. 108-113.
- KROTO, H.W.; J.R. HEATH; S.C. O'Brien; R.F. CURL y R.E. SMALLEY: "C₆₀: Buckminsterfullerene", *Nature*, 318 (1985), pp. 162-163.
- MCNEIL, S.E.: "Nanotechnology for the Biologist", *Journal of Leucocyte Biology*, 78 (2005), pp. 1-10.
- O'CONNELL, M.J.; S.M. BACHILLO; C.B. HUFFMAN; V.C. MOORE; M.S. STRANO; E.H. HAROZ; K.L. RIALON; P.J. BOUL W.H. NOON; C. KITTRELL; J.P. MA; R.H. HAUGE; R.B. WEISMAN y R.E. SMALLEY: "Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes", *Science*, 297 (2002), pp. 593-96.
- PANTAROTTO, D.; C.D. PARTIDOS; R. GRAFF; J. HOEBEKE; J.P. BRIAND; M. PRATO y A. BIANCO: "Synthesis, Structural Characterization, and Immunological Properties of Carbon Nanotubes Functionalized with Peptides", *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 20 (2003), pp. 6160-6164.
- PASTORIN, G.; W. WU; S. WIECKOWSKI; J.P. BRIAND; K. KOSTARELOS; M. PRATO y A. BIANCO: "Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery", *Chem Comm.*, 11 (2006), pp. 1182-1184.
- SINGH, R., D. PANTAROTTO; L. LACERDA; G. PASTORIN; C. KLUMPP; M. PRATO; A. BIANCO y K. KOSTARELOS: "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers", *Proceedings of the National Academy of Science*, 103, 9 (2006), pp. 3357-3362.

Notas

- 1 Alberto Bianco: "Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes", p. 571.
- 2 Kroto: "C₆₀: Buckminsterfullerene" p. 162.
- 3 Bachillo: "Structure-assigned optical spectra of single-walled carbon nanotubes", p. 2361.
- 4 O'Connell: "Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes", p. 593.
- 5 Flahaut: "Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. Chemical Communications", p. 1442.
- 6 Bahr: "Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds", p. 3823.
- 7 Georgakilas: "Organic Functionalization of Carbon Nanotubes", p. 760.
- 8 Friddle: "Single functional group interactions with individual carbon nanotubes", p. 692.
- 9 Kostarelos: "Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type", p. 108.
- 10 *Ibidem*, p. 3.
- 11 Kostarelos: "Establishing nanomedicine", p. 259.
- 12 Singh: "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers", p. 3357.
- 13 Helland: "Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes", p. 1125.
- 14 Apoptosis: muerte celular programada.
- 15 Ding: "Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast", p. 2448.
- 16 Alberto Bianco: artículo citado, p. 571.
- 17 Fitis: "Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumor", p. 3148.
- 18 Alberto Bianco: artículo citado, p. 571.
- 19 Pantarotto: "Synthesis, Structural Characterization, and Immunological Properties of Carbon Nanotubes Functionalized with Peptides", p. 108.
- 20 Alberto Bianco: artículo citado, p. 571.
- 21 Pastorini: "Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery", p. 1182.
- 22 *Ibidem*, p. 6.
- 23 Alberto Bianco: artículo citado, p. 571.
- 24 *Idem*. 