

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
Del 3 de abril de 1981



LA VERDAD
NOS HARÁ LIBRES

UNIVERSIDAD
IBEROAMERICANA

CIUDAD DE MÉXICO ®

“EL EFECTO DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS Y SU
POLIMERIZACIÓN CON POLI-ÁCIDO CÍTRICO EN CONTACTO CON
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES IN VITRO”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Presenta

ROSA LUZ GARNICA GUTIÉRREZ

Director: Dr. Felipe Cervantes Sodi

Codirector: Dr. Salomón Hernández Gutiérrez

Lectores: Dr. Rodolfo Estrada Guerrero; Dra. Esther Ramírez Meneses y Dr. Javier
Estrada Mena

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por sostenerme y permitir que mis convicciones y luchas estén siempre dirigidas a servir.

A mi madre, por ser mi mayor apoyo, por guiarme siempre con ejemplo de fidelidad y fortaleza.

A mis hermanos, por ser los mejores y aprender de ellos el mayor ejemplo de unidad y alegría.

A mi familia, por enseñarme a crecer, por enseñarme a creer, por enseñarme a querer, encontrando en los detalles pequeños de cada día la grandeza de su compañía.

A mis amigos, por crecer y soñar juntos, por acompañarme en los grandes momentos, sin importar si han sido triunfos o fracasos.

Al Dr. Félix Martínez, por creer en mí, por ser uno de los apoyos más importantes en mi vida profesional y por permitirme realizar estos estudios de maestría. Uno este agradecimiento a la Universidad Panamericana, donde he encontrado siempre las puertas abiertas y el interés en que su personal se desarrolle profesionalmente.

A mi asesor, Dr. Felipe Cervantes Sodi, por creer en mí, por su admirable capacidad de seguimiento, por estar siempre cuando lo necesité, por sus constantes ánimos y sobre todo, porque sin él no hubiera sido posible perseverar en el proyecto.

A mi asesor, Dr. Salomón Hernández, por su apoyo, por guiar este trabajo y permitir la colaboración en sus proyectos de investigación. Uno este agradecimiento a la Facultad de Ciencias de la salud de la Universidad

Panamericana, por posibilitar la realización de las experimentaciones biológicas en sus instalaciones.

A Andrés Lara, por apoyarme siempre con ánimo, tiempo y conocimientos en este proyecto.

A la Dra. Anabel Arrieta, por el gran apoyo y seguimiento a los alumnos de la Maestría en Ciencias de la ingeniería.

Al Dr. Eduardo Palacios, por colaborar con nosotros en la obtención de micrografías (SEM y TEM), fundamentales para la realización de este proyecto.

Al Dr. Felipe Masso, por colaborar con nosotros en la obtención de resultados de apoptosis con el equipo de citometría de flujo.

A la Dra. Alejandra Contreras, por colaborar con nosotros en la obtención de imágenes confocales.

A Samuel Rosas, Mónica Ballesteros-Villareal, Agustín Iñiguez-Rabago. Samuel Macías, Rodolfo Estrada, Eduardo J.M y al Dr. Vicente Garibay-Febles, por el apoyo fructífero en los diferentes experimentos y caracterizaciones.

A todos mis profesores y colegas, por el apoyo, por su enseñanza y sobre todo por crecer en mí un mayor interés en la investigación científica.

INDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo general.	10
2.2. Objetivos específicos.	10
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1. Nanotubos de Carbono.	17
3.1.1. Propiedades.	19
3.1.1.1. Propiedades eléctricas.	19
3.1.1.2. Propiedades mecánicas.	21
3.1.1.3. Propiedades térmicas.	21
3.1.1.4. Propiedades de dispersión.	21
3.1.2. Síntesis y crecimiento de Nanotubos de carbono.	22
3.1.2.1. Dopaje.	23
3.1.3. Purificación.	24
3.1.4. Funcionalización.	25
3.1.4.1. Funcionalización ácida.	26
3.1.4.2. Funcionalización con polímeros.	28
3.1.4.2.1. Polimerización con PCA.	28
3.1.4.2.2. Polimerización con biomacromoléculas.	30
3.1.4.2.3. Otros polímeros.	30
3.2. Células madre mesenquimales (MSC).	31
3.2.1. Importancia de células madre mesenquimales en regeneración de tejido.	32
3.3. CNTs y células madre mesenquimales.	33
3.3.1. Biocompatibilidad de MWCNT y células mesenquimales.	33
3.3.2. Andamiaje.	35
3.3.3. Citotoxicidad de CNTs.	36
3.3.3.1. Apoptosis.	37
3.3.3.2. Proliferación.	38
3.3.3.3. Morfología.	39
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
4.1. Síntesis de CNT.	40

4.1.1. Síntesis de Nanotubos de Carbono multicapa (MWNT) y dopados con Nitrógeno (CNx).	41
4.1.2. Síntesis de MWNTs y CNx en trozos de cuarzo.	42
4.2. Funcionalización ácida de MWNTs y CNx.	43
4.3. Polimerización con ácido <i>poli</i> -cítrico en fMWNT y fCNx para obtener PMWNTs y PCNxs.	43
4.4. Caracterización de CNT.	44
4.5. Cultivo celular.	45
4.5.1. Extracción.	45
4.5.2. Obtención in vivo de la médula ósea.	45
4.5.3. Cultivo celular <i>in vitro</i> .	47
4.6. Proliferación.	47
4.7. Ensayo de Apoptosis.	47
4.8. Confocal.	48
4.9. Estadística.	48
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
5.1. Caracterización de CNT.	50
5.2. Efectos biológicos de CNT en células mesenquimales.	56
5.2.1. Proliferación celular.	56
5.2.2. Apoptosis.	56
5.2.3. Morfología.	59
6. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	65
7. REFERENCIAS	67
8. ANEXOS	74
8.1. Figuras.	74
8.2. Glosario de Acrónimos	77

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Morfología de MWNTs y SWNTs (TEM).	18
Figura 2. Estructuras de CNTs según plegamiento.	19
Figura 3. Imagen TEM que muestra una aglomeración de nanotubos.	22
Figura 4. Modelo de Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno.	24
Figura 5. Proceso de funcionalización ácida.	26
Figura 6. Estructuras 3D de CNTs crecidos perpendicularmente en trozos de cuarzo.	27
Figura 7. Polimerización con ácido poli-cítrico.	29
Figura 8. Potencial de diferenciación de las MSCs.	32
Figura 9. Mecanismo de Internalización de CNTs a nivel celular.	34
Figura 10. Sistema estándar de síntesis de nanotubos de carbono.	41
Figura 11. Caracterización por SEM/TEM de CNTs funcionalizados y polimerizados.	51
Figura 12. Espectro Raman.	53
Tabla 1. EDS, diámetro y relación I_D/I_G de los CNTs caracterizados.	54
Figura 13. Espectro IR de los CNTs caracterizados.	55
Figura 14. Efectos de proliferación en MSCs en contacto con CNTs.	57
Figura 15. Efectos de apoptosis en MSCs en contacto con CNTs.	59
Figura 16. Imágenes de microscopio confocal.	61
Figura 17. PMWNTs en contacto con MSCs.	62
Figura 18. Simulación de interacción PCNT-MSCs.	64
Figura A1. Caracterización termo-gravimétrica (TGA).	74
Figura A2. Crecimiento de nanotubos de carbono en cuarzo.	74
Figura A3. Micrografía SEM a 5μ de MWNTs antes de someterlos a tratamiento.	75
Figura A4. MWNTs después de funcionalizarlos a tratamiento ácido (3:1 $H_2SO_4:HNO_3$).	75
Figura A5. Micrografía SEM a 5μ de CNx antes de someterlos a tratamiento ácido.	75
Figura A6. CNxs después de funcionalizarlos a tratamiento ácido (3:1 $H_2SO_4:HNO_3$).	76
Figura A7. Longitud promedio de MWNTS alcanzada a 15 minutos de CVD. (A. det EDT).	76
Figura A8. Imágenes SEM de MWNTs que representan las muestra de medición de diámetro (A) det EDT, B) det. TLD).	76
Figura A9. Longitud promedio de CNxs alcanzada a 15 minutos de CVD. (A. det EDT).	77

“El efecto de los nanotubos de carbono funcionalizados y su polimerización con ácido *poli*-cítrico en contacto con células madre mesenquimales *in vitro*”

1. RESUMEN

Los avances en la investigación de biomateriales han probado que los nanotubos de carbono (CNTs, *carbon nanotube*), estructuras alotrópicas en las que se puede presentar el carbono, son un material con una amplia gama de aplicaciones biomédicas.

En el presente trabajo, se sintetizó un tipo de nanotubo denominado de pared múltiple o multicapa (MWNTs, *multi wall carbon nanotubes*), cuyo proceso de síntesis se realizó mediante deposición química de vapores (CVD, *chemical vapor deposition*). Su crecimiento se favoreció por las nanopartículas de Fe utilizadas como catalizadores.

Es conocido que cada aplicación biomédica debe tener un diseño puntual del biomaterial que se vaya a utilizar, según los distintos usos que se le pueda y pretenda dar. En el caso de estos MWNTs, en el campo biomédico, se utilizan para formar estructuras de andamiaje celular, como vehículos para transportar fármacos, transmisores de señales, etc.

Las aplicaciones biomédicas requieren un control de asepsia elevado. Por esta razón, los nanotubos sintetizados fueron purificados mediante el proceso de funcionalización ácida como medio de eliminación de la mayor cantidad posible de contaminantes. Además de esta purificación, como las propiedades hidrofóbicas de los nanotubos impiden su buena dispersión en los sistemas biológicos, el proceso de funcionalización posibilita modificar su estructura,

logrando colocar grupos funcionales en sus paredes laterales que proporcionan una mejor difusión.

Con la finalidad de determinar el nivel citotóxico del material y conocer su viabilidad, en esta investigación se utilizó un ensayo biológico *in vitro* de células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal stem cells*) de médula ósea.

En consonancia con lo explicado anteriormente, el diseño del biomaterial utilizado se basó en el uso de nanotubos de carbono multicapa puros (MWNT) y dopados con nitrógeno (CNx), ambos funcionalizados con ácido, para obtener un grupo al que se nombró fCNT, una porción de cada tipo de nanotubo de este grupo se les añadió ácido poli-cítrico (PCA, *Poly Citric Acid*), para obtener el segundo grupo de PCNT, modelo nunca antes utilizado en contacto con MSCs.

Al comparar los resultados con las muestras control, se pudo observar que la presencia de fCNTs y polimerizados con PCA (PCNT) interactuando con MSC, alteran los procesos celulares de proliferación y apoptosis, además de provocar modificaciones de su morfología.

Estos efectos se dieron de distinta forma en los distintos grupos estudiados, lo que permitió realizar comparaciones y valoraciones entre ellos. Los resultados mostraron que el grupo de los PCNTs son menos citotóxicos que los fCNTs. Sin embargo de este grupo (PCNTs), los polimerizados sin dopar (PMWNT) ocasionaron menor muerte celular apoptótica que los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno y polimerizados con ácido poli-cítrico (PCNx).

Del grupo de los fCNT, los multicapa (fMWNTs) presentaron el mayor efecto de proliferación. Por otro lado, los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno y funcionalizados (fCNx), tuvieron la mayor actividad apoptótica.

Comparando de manera global los nanotubos funcionalizados y los polimerizados, los PCNTs presentaron una menor capacidad de internalización celular, previniendo la activación de la ruta apoptótica.

2. OBJETIVOS

2.1 General.

Generar y caracterizar un conjunto de nanotubos de carbono funcionalizados y polimerizados con PCA, para evaluar por primera vez, entre otras cosas, su mecanismo de internalización en la célula, capacidad de inducir proliferación y su citotoxicidad en un modelo de células madre mesenquimales *in vitro*.

2.2 Específicos.

- i. Sintetizar tanto nanotubos de carbono multicapa puros (MWNTs) como nanotubos de carbonos dopados con nitrógeno (CNx), con la finalidad de evaluar cuál reacciona mejor a la funcionalización y polimerización, y con esto analizar el comportamiento de cada uno en presencia de MSCs.
- ii. Funcionalizar los dos tipos de nanotubos en solución ácida ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:3 M) con el propósito de obtener grupos carboxilo en las paredes periféricas.
- iii. Polimerizar los nanotubos que fueron funcionalizados para una mejor dispersión en soluciones acuosas y aumentar la posibilidad de interacción con las MSCs.
- iv. Caracterizar los nanotubos, con la finalidad de conocer sus propiedades finales y verificar su adecuada funcionalización y polimerización.

- v. Aislar y cultivar células madre mesenquimales (MSCs) de rata para evaluar diferentes parámetros biológicos de comportamiento celular en un modelo celular genéticamente inalterado.

- vi. Analizar las respuestas celulares de proliferación, apoptosis y morfología de las MSCs en contacto con los nanotubos.

- vii. Comparar y generar información detallada del efecto que tienen la funcionalización ácida y la polimerización con ácido poli-cítrico (PCA), sobre los CNTs utilizados a diferentes concentraciones y su interacción con las MSCs.

3. MARCO TEÓRICO

Los avances en la investigación de biomateriales, han probado que los nanotubos de carbono son un material importante en el área biomédica, incluyendo de modo notable en la ingeniería de tejidos, ya que se ha descubierto que pueden ser utilizados en el mejoramiento del rastreo celular, detección de microambientes, como vehículos portadores de fármacos [1], en la diferenciación celular a partir de estímulos eléctricos [2], como andamiaje o soporte para la incorporación de tejido celular [3], [4], entre otros.

La sustitución o reparación a nivel celular de un órgano o tejido no funcional, para recuperar su función habitual total o parcial ha necesitado una profunda búsqueda de opciones que permitan dicha regeneración. Mediante el uso de células madre en cultivo, junto con el avance y la implementación de materiales biomiméticos, se ha abierto un campo de estudio importante que hoy en día se denomina medicina regenerativa [5].

La medicina regenerativa se fundamenta en la terapia celular, que consiste en la transfusión o trasplante de células a un paciente para el tratamiento de una enfermedad [5], presentando un panorama prometedor para tratar enfermedades e incluso para curar aquellas que son degenerativas o incurables.

Muchas estirpes celulares han sido utilizadas para la terapia celular, sin embargo teóricamente las más valiosas en términos de diferenciación son aquellas células que provienen directamente de los embriones, obtenidas después de las primeras horas de fecundación, sin embargo es bien sabido que las limitaciones técnicas y por el comportamiento inestable de su genoma advierten complicaciones en su manejo, debido a esto y a los problemas éticos que representan trabajar con estas células [6], se iniciaron investigaciones que pudieran simular el comportamiento embrionario logrando la reprogramación de fibroblastos hacia

un estado de células madre pluripotenciales capaces de convertirse en cualquier otro tipo celular [7]. Se introdujeron factores de transcripción responsables de inducción de pluripotencialidad y después incorporar estos factores, Yamanaka observó que algunos de ellos formaban colonias con características similares a las células madre, posteriormente, redujo a cuatro el número de factores de transcripción implicados en esta reversión (Myc, Oct4, Sox2, Klf4) y las células resultantes se denominaron células Inducidas Multipotentes (*iPS*, *induced Pluripotent Stem*) [7]. Estas células presentan una versatilidad equivalente a la de las células madre embrionarias, superando con esto inconvenientes éticos y problemas de rechazo inmunológico [8].

Por otra parte, las células madre mesenquimales, por tener un inmenso potencial regenerativo y de diferenciación, aunque limitado, son una magnífica opción en la ingeniería de tejidos, ya que permiten a partir de su manipulación, sobre todo la construcción de andamios celulares que favorecen la formación de tejido, el cual puede sustituir el tejido dañado [4], sin embargo su capacidad de migración puede resultar ser una limitación para lograr tener un buen anclaje.

Experimentos recientes han demostrado que la aplicación de MSCs por suspensión en las zonas dañadas, producen escasas mejoras por el poco acoplamiento electromecánico entre células de tejido y las células suministradas [5].

Un ejemplo de este problema se ha presentado con los monocitos de médula ósea, mioblastos y MSCs aplicadas por suspensión al corazón humano infartado, analizando el comportamiento y los resultados de estas últimas células a diferentes tiempos y por diversas rutas (intravenosa, intracoronaria, inyección directa en el miocardio en operaciones a corazón abierto) [5]. Estos procedimientos produjeron escasas mejoras en las funciones cardiacas y la supervivencia de las células implantadas fue limitada. No hubo interacción con los cardiomiocitos pre existentes, ni acoplamiento electromecánico a través de

las uniones celulares, por lo cual, las células implantadas no soportan las fuerzas mecánicas ni las condiciones de hipoxias a las que se ven sometidas [9].

Otro problema que existe es que las MSCs una vez introducidas al cuerpo de manera sistémica [10], pueden implantarse en cualquier tejido que haya sufrido algún tipo de lesión sin importar el grado de ella, además expresan varios receptores de citoquinas que las movilizan por todo el cuerpo, dando lugar a que su capacidad de migración no sea estable y menos en sistemas *in vitro* porque con el tiempo, van presentando disminución en la expresión de células de adhesión, pérdida de receptores de citoquinas y por lo tanto falta de respuesta quimiotáctica [5].

En vista de la escasa tasa de supervivencia y de las dificultades que presenta la implantación celular, se han generado nuevas estrategias que combinen células, biomateriales y factores de crecimiento, que generen una estructura compatible con el tejido a tratar y favorezcan la supervivencia celular [4] [11]. Para esto es necesario incentivar la investigación de biomateriales que se utilicen como base para favorecer el crecimiento celular y mejorar así el seguimiento y la evaluación de los tejidos construidos, es decir, que funcionen como andamiaje [3], [4], [12].

El diseño de biomateriales abre un nuevo panorama permitiendo mejorar la supervivencia celular, ya que las células atrapadas en una estructura, pueden ser condicionadas con diferentes factores de crecimiento que favorecen la conservación celular; además de que en estas condiciones las células quedan protegidas por las fuerzas mecánicas que les proporciona el material [11] [13].

Entre los materiales que se están utilizando se encuentran las diferentes nanopartículas, las cuales se están convirtiendo en componentes importantes para el diseño de biomateriales [14], [15] en el campo de regeneración de tejidos [4], [16]. En partículas, los CNTs ya han sido utilizados con éxito como andamios para crecimiento celular o tisular [17], [18], [19], [20], proporcionando un

refuerzo estructural a la célula y ayudando a dirigir su crecimiento [4].

Los nanotubos de carbono, material que presenta notables propiedades ópticas, eléctrica, térmicas y mecánicas [13], [14], han sido explorados por sus viables aplicaciones en áreas biológicas [3], [15] como rastreadores de detección en micro-ambientes celulares, como vehículos para la administración de agentes [1] o en la diferenciación celular por estímulos eléctricos [2], entre otros.

Con el fin de obtener características biocompatibles en los CNTs, y debido a su comportamiento hidrofóbico, los CNTs son comúnmente sometidos a diferentes procesos de funcionalización. El más común de ellos, consiste en un tratamiento ácido, para purificarlos y generar en ellos grupos carboxílicos en las paredes, obteniendo así nanotubos de carbono funcionalizados (fCNT) [21], [22]. Sin embargo, en algunos casos se ha encontrado que este tratamiento puede causar efectos citotóxicos en líneas celulares específicas [19], [22], [23].

Otra manera de generar grupos funcionales en los CNTs, mediante la modificación con polímeros dendríticos hiperramificados y biocompatibles [1], [24], [25] los cuales consisten en generar cadenas similares a las moléculas presentes en la matriz extracelular [25], con ello se permite, dar una mayor biocompatibilidad y una mejor interacción entre los CNTs polimerizados y las células. Además, algunos polímeros también mejoran la solubilidad de los CNTs en agua, de capital importancia para su dispersión en fluidos biológicos [23].

Por ejemplo, el tereftalato de polietileno (PET) y poliuretano (PU), han mostrado una respuesta celular favorable en MSCs [26]. El polietilenglicol sintético (PEG) se han usado como andamios para MCSs [6], con el uso de PEG, [20] se ha logrado formar una fina capa (PEGylated) en los MWNT, influyendo en la proliferación y la morfología de las MSCs humanas (hMSC), favoreciendo su proceso de diferenciación [20].

Sin embargo, algunos resultados de la toxicidad de los nanotubos de carbono polimerizados con PET , PU y PEG [6] [20], [26], [27], sugieren que estas polimerizaciones causan efectos tóxicos sobre las MSCs , lo que lleva a la continua búsqueda de diferentes polímeros, no citotóxicos.

Recientemente, el ácido poli-cítrico (PCA) [1], [24], [28], [29], [30], [31], [32], [33], un polímero hiper-ramificado con una superficie altamente biocompatible [1], se ha propuesto para la construcción de andamios y para aumentar las propiedades hidrofílicas de CNT [24], [30], permitiendo la reducción en la agregación de partículas y el tamaño de poli-dispersión y en consecuencia disminuir la citotoxicidad [1], [31], [32]. Además, se ha descubierto que este proceso de polimerización PCA no genera partículas contaminantes [29].

La polimerización de MWNTs con PCA, comienza con los MWNTs funcionalizados con ácido (fMWNT) y es seguido por la adición de PCA, donde se unen covalentemente grupos funcionales carboxílicos del PCA a los fMWNTs a través de una reacción de esterificación, obteniendo nanotubos con ácido poli-cítrico-MWNT (PWNT), material interesante para aplicaciones en nano- medicina [15], [24], [29], [30], [33].

En este trabajo de investigación, el modelo celular elegido para las pruebas de biocompatibilidad con PCA fueron las MSCs debido a los siguientes factores: En primer lugar, por su la capacidad proliferativa, que es un aspecto fundamental para el diseño y producción de andamios con MSCs [34]. Como se mencionó con anterioridad, experimentos recientes han demostrado que, debido a la falta de anclaje entre las células suministradas y el tejido, la capacidad proliferativa de MSCs aplicada por suspensión directamente en áreas dañadas, produce pocas o nulas mejoras en el tejido circundante dañado [35], así la producción de andamios adecuados para la proliferación y el anclaje de las MSCs es un aspecto fundamental para el presente y futuros estudios [34]. Las MSCs cultivadas en andamios son una opción real en el campo de la ingeniería de tejidos [36] para la

formación de tejido nuevo o para sustituir o regenerar la zona dañada [4], [37]. La interacción de CNT polimerizados con las MSCs pueden influir en el comportamiento celular y promover la adhesión [25], [38]. Curiosamente, este material también puede cambiar la morfología en las células madre [39], [40], brindando señales que pueden promover la proliferación o diferenciación [25].

En segundo lugar, el trabajo con las MSCs derivadas de cultivos primarios (médula ósea), asegura un cuadro genético limpio y claro, sin la presencia de trastornos genéticos como los presentados en líneas celulares previamente pre-establecidas y caracterizadas, como las líneas celulares tradicionales [41]. Por lo tanto las MSCs son un excelente modelo para evaluar varios parámetros biológicos como proliferación, apoptosis y citotoxicidad en medio de un ambiente genético no alterado [34], esto al mismo tiempo hace que se convierta en un modelo de alta sensibilidad para inducir cambios en patrones de diferenciación multi-potentes [38], [39], [40] y de proliferación [25].

Basados en informes de efectos citotóxicos provocados por los fCNTs [19], [21], [22] y CNT polimerizados (PCNT) con PEG , PU y PET [6], [20], [26], antes de considerar el uso de cualquier tipo de PCNT como modelo de andamiaje biológico para las MSC, es obligatorio y fundamental llevar a cabo ensayos citotóxicos de aquellas células que potencialmente puedan estar en contacto con fCNTs y con los PCNTs.

3.1. Nanotubos de Carbono

El carbono, elemento que puede formar estructuras estables en diferentes formas alotrópicas, proporciona ejemplos de materiales que muestran toda una gama de estructuras nano-métricas [41], como los fulerenos [42], los nanotubos de carbono, el grafeno [43], etc. El carbono, en sus diferentes formas puede comportarse como un buen conductor metálico en forma de grafito o como

aislante en la forma de diamante, o bien diferente grado de semiconductividad como en los nanotubos de carbono.

A partir de los descubrimientos de estructuras fibrilares de carbono y de los nanotubos de carbono por Sumio lijima en 1991 [44], [45], [46], estas nanoestructuras comenzaron a estudiarse para diferentes aplicaciones, como materiales de refuerzo, sensores, almacenamiento de energía, dispositivos electrónicos moleculares, en aplicaciones biomédicas, etc [47].

Las formas de mayor importancia de nanotubos de carbono son los de pared simple, conocidos como *Single Wall Carbon Nanotube* (SWNT) y de capas múltiples conocidos como *Multi Walled Carbon Nanotubes* (MWNT) [48], representados en la figura 1.

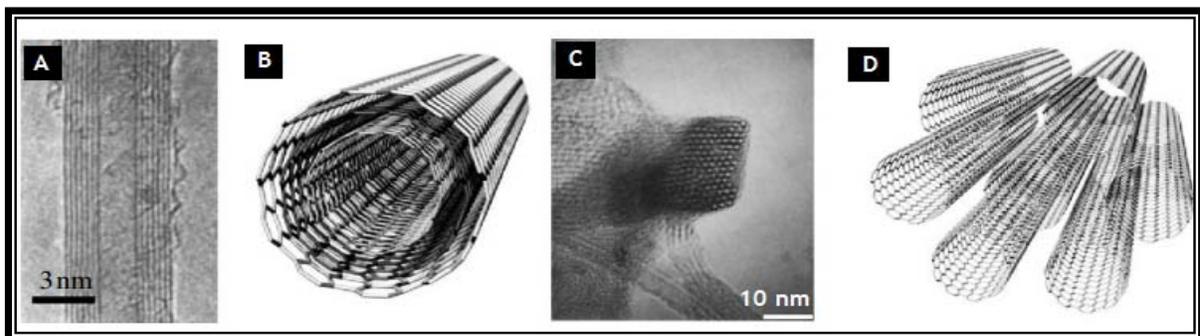


Figura 1. Morfología de MWNTs y SWNTs (TEM). A) y C) imágenes obtenidas en un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM), en A) se muestra la micrografía de la morfología básica que puede tener el nanotubo de carbono de pared múltiple [49] y en C) un paquete de nanotubos de carbono de pared única a escala de 10 nm. En B) un esquema de un nanotubo de carbono de pared múltiple. En D) un esquema de nanotubos de pared única.

Para la presente investigación se emplearon MWNTs, que consisten en varios tubos coaxiales con diferente diámetro uno dentro de otro, como se muestra en la Figura 1B, separados por fuerzas de van der Waals con un espacio aproximado de 3.4 Å [50][51].

Los CNTs de una sola capa pueden presentar diversas morfologías en el acomodo de los hexágonos de la red de grafeno respecto al eje longitudinal. En la figura 2 [41]; se observa que dependiendo de la manera en que se encuentre “ensamblado” el nanotubo, éste puede clasificarse como zigzag, armchair o quiral. La morfología determina las propiedades electrónicas del nanotubo y por lo tanto determina si son conductores o semiconductores, por ejemplo, mientras que los tipos zigzag y armchair son conductores, los de tipo quiral son semiconductores por la disposición electrónica [48]. (Figura 2)

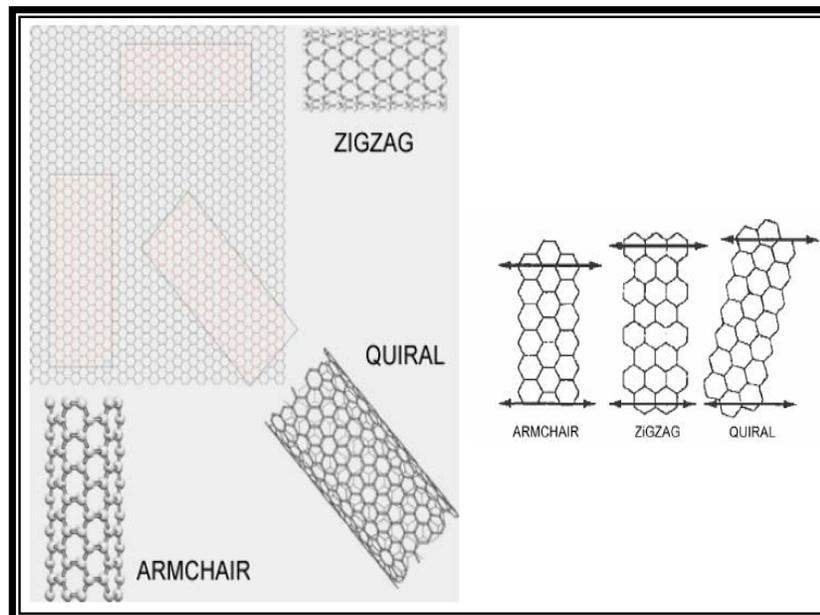


Figura 2. Estructuras de CNTs según plegamiento. Formas que pueden adquirir las estructuras de anillos hexagonales que conforman los nanotubos de carbono según el plegamiento de una lámina de Grafeno [41].

3.1.1. Propiedades

Durante los últimos 20 años ha habido un enorme interés en optimizar la síntesis de nanotubos de carbono y aplicar sus propiedades en nanotecnología y en ciencia de materiales [51] debido a que presentan un elevado módulo de Young, una excelente absorción óptica y conductividad térmica, superconductividad a bajas temperaturas y pueden presentar propiedades metálicas o semiconductoras, entre otras [52].

3.1.1.1. Propiedades eléctricas

En el caso de los nanotubos de carbono conductores, se ha descrito que un electrón en el interior del nanotubo experimenta una conducción balística sin impedimento alguno y con un movimiento uniformemente acelerado en función del campo eléctrico [48].

La morfología de los nanotubos de carbono se caracteriza por ser un cilindro de diámetro, la mayoría de las veces constante y de una longitud variable que puede alcanzar hasta varios milímetros, esta extensión depende del tiempo y del tipo de síntesis. La alta relación entre longitud/diámetro unida a la alta conductividad eléctrica [48], hace que estos materiales puedan considerarse como “cables moleculares” cuando el nanotubo es de tipo conductor.

En cuanto a la capacidad para transportar corriente, se sabe que los nanotubos de carbono, en concreto los SWNTs conductores [52], pueden llegar a cantidades de, aproximadamente, mil millones de A/cm^2 , mientras que los hilos de cobre convencionales se funden al llegar a densidades de corriente del orden del millón de A/cm^2 . Conviene precisar que todas estas propiedades no dependen de la longitud del nanotubo, a diferencia de lo que ocurre en los metales [51].

En sistemas biológicos, esta propiedad eléctrica puede ser utilizada para promover la diferenciación de las células madre mesenquimales, utilizando una estimulación eléctrica externa promoviendo una serie de respuestas celulares incluyendo la reorientación y la angiogénesis, regeneración de las células musculares, miogénesis de fibroblastos, y la cardiomiogénesis de las células madre embrionarias, etc [2].

Los nanotubos de tipo semiconductor son interesantes para desarrollar transistores de efecto campo a escala nanométrica [48], [53].

Hay que destacar que los nanotubos con elevada conductividad actúan como conductores cuánticos, es decir, si se presenta un diferencial de potencial frente a la intensidad de corriente no se obtiene una línea recta, sino escalonada [52].

3.1.1.2. Propiedades mecánicas

La estabilidad de los átomos de carbono con hibridación del tipo sp^2 , les proporciona la capacidad de formar fuertes y estables enlaces interatómicos dando lugar a uno de los materiales más resistentes actualmente conocidos. El módulo de Young de los nanotubos se ha estimado entre los 1.3 y 1.8 terapascales, dependiendo si son SWNT o MWNT [51].

3.1.1.3. Propiedades térmicas

Algunos modelos predicen que la conductividad térmica de los nanotubos puede llegar a ser tan alta como 6000 W/mK a temperatura ambiente [51].

Asimismo, los nanotubos de carbono son estables térmicamente, resistiendo sin descomponerse a temperaturas de 2800 °C en el vacío y 750 °C en el aire, sin embargo, estas propiedades pueden modificarse al encapsular metales o gases en su interior [51].

3.1.1.4. Propiedades de dispersión

Debido a su morfología y a su alta relación de aspecto (largo/diámetro) donde el material expone gran área superficial con enlaces “ π ” continuos, los nanotubos presentan una gran tendencia a sufrir aglomeración formando “manojos” de nanotubos que se encuentran interaccionando fuertemente a través de fuerzas de Van der Waals (Figura 3) [48]. La aglomeración de los CNTs en manojos plantea problemas en nanotecnología cuando se quieren estudiar las propiedades de un único nanotubo de carbono y además cuando se quiere proceder a la solubilización o suspensión de los nanotubos en disolventes. El problema de la elevada tendencia de los nanotubos de carbono a sufrir aglomeración ha sido

tratado mediante diversas metodologías entre los que se incluyen diferentes técnicas de sonicación, adición de surfactantes, funcionalización a través de formación de complejos o enlaces covalentes [48], etc.

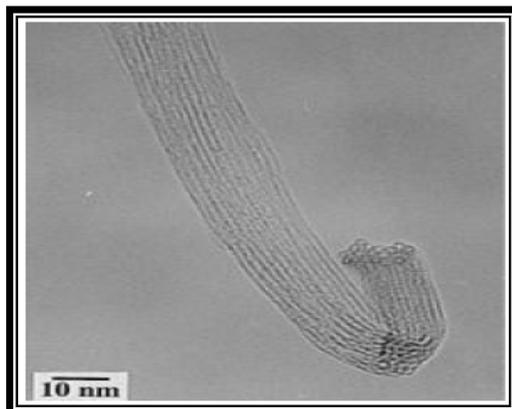


Figura 3. Imagen TEM que muestra una aglomeración de nanotubos [48].

3.1.2. Síntesis y crecimiento de Nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono han podido ser sintetizados utilizando diferentes métodos de obtención, como por ejemplo a partir de descargas por arco eléctrico en electrodos de grafito, vaporizando el grafito por pulsos de láser, por pirolisis [13] o por CVD [54], que es el método comercial más ampliamente utilizado para producirlos a gran escala.

Un sistema CVD térmico se compone principalmente de un horno con un reactor de cuarzo tubular que opera alrededor de los 800°C y a presiones desde los 0.001 hasta 1 atm. Generalmente se utiliza un tubo de cuarzo el cual permite la producción en masa de los nanotubos [41], como se muestra más adelante en la figura 10.

El crecimiento de los nanotubos de carbono alineados verticalmente se demostró por primera vez en un sistema CVD, en el que nano-partículas de un catalizador metálico se incrustan directamente en una placa de sílice o cuarzo. Sobre las partículas metálicas se adsorbe carbono proveniente de un gas precursor, el gas se descompone, el carbono se difunde y forma el nanotubo de carbono [55]. El

tamaño del catalizador determina el diámetro del nanotubo [45][46]. La tasa de crecimiento y la densidad de los nanotubos de carbono está determinada por factores como la presión, el gas precursor y flujo utilizados, la temperatura, etc. Si la partícula tiene un diámetro mayor a 20 nm pueden crecer con mayor probabilidad nanotubos de pared múltiple o multicapa (MWNT). El crecimiento de nanotubos de carbono generalmente se explica por el modelo vapor-líquido-sólido (VLS, *vapor liquid-solid*) o vapor-sólido-sólido (VSS, *vapor solid-solid*) [56][57], en el cual los átomos de carbono en estado *vapor o gaseoso*, son catalizados por la partícula metálica, *líquida o sólida*, para formar la estructura fibrilar, *sólida*, de carbono o nanotubo de carbono [56].

3.1.2.1. Dopaje

Este proceso consiste en introducir durante el proceso de síntesis, algún tipo de impureza en la estructura del nanotubo de carbono de manera controlada y predeterminada, con el fin de alterar sus propiedades originales [58].

Actualmente, los nanotubos de carbono multicapa dopados con nitrógeno (CNx) son muy investigados, debido a sus propiedades eléctricas y mecánicas y a que tienen mayor conducción que los nanotubos sin dopar [58].

La morfología de los CNxs durante la síntesis también es alterada por la concentración de nitrógeno. El nitrógeno tiende a concentrarse en los pentágonos induciendo flexión fuerte en los enlaces, produciendo más zonas de defecto en las paredes, afectando su cristalinidad en la superficie y dando una estructura en forma de bambú (Figura 4).

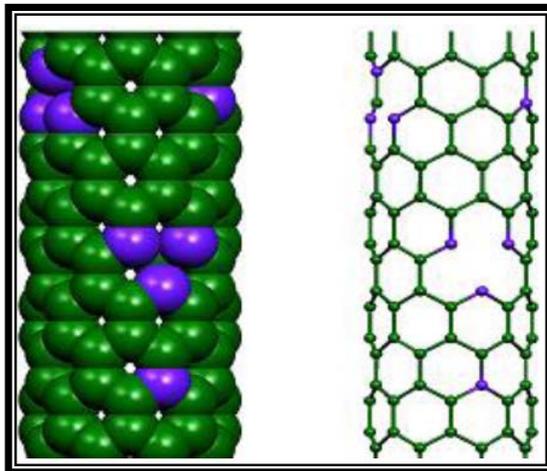


Figura 4. Modelo de Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno. Modelo que muestra la estructura común de un nanotubo dopado con nitrógeno, donde el color azul simboliza los nitrógenos presentes en la estructura, mientras que la zona verde representaría los enlaces de carbono [58].

3.1.3. Purificación

Durante el crecimiento de nanotubos existe la posibilidad de que existan rastros de partículas provenientes del catalizador [59], o algún otro compuesto que haya estado en contacto con el nanotubo durante el crecimiento que se encuentren en la estructura final del nanotubo, es por eso que dependiendo para qué sea el uso del nanotubo, es conveniente que se purifique. En el caso de la aplicación que le daremos para el trabajo de tesis, es indispensable, ya que la finalidad de la presente investigación es que este material tenga contacto con sistemas biológicos y generalmente el contacto con partículas metálicas podría ser dañino [57] [58].

Es en estas posibles aplicaciones donde el biomaterial interactúa directamente con la célula, es de gran importancia realizar la purificación de los materiales y posteriormente la funcionalización para favorecer la interacción entre la célula y el nanotubo [19].

Hay varios métodos para purificar los nanotubos de carbono [60], [61], [62], [63], un ejemplo y el más utilizado es el ácido nítrico y ácido sulfúrico, soluciones que

actúan como oxidantes, los cuales a su vez eliminan los catalizadores de metales del interior y exterior del tubo. Además, los ácidos pueden atacar a los extremos más reactivos de los nanotubos de carbono, dando origen a grupos de ácido carboxílico en la superficie del nanotubo, que a su vez estos grupos pueden ser funcionalizados, permitiendo la interacción química de la superficie del nanotubo con otros componentes de interés biológico, en este caso la membrana celular [64].

3.1.4 Funcionalización

La funcionalización es un proceso químico mediante el cual se incorporan grupos funcionales reactivos a la superficie de los nanotubos [65]. Los nanotubos de carbono, como ya se dijo anteriormente, poseen extraordinarias propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas, sin embargo, su funcionalización les hace adquirir propiedades específicas adicionales.

Los MWNTs presentan un amplio diámetro interno que pueden ser explotado para la encapsulación de moléculas terapéuticas, y una superficie externa que ofrece posibilidades de interacción con diferentes moléculas [66]. Por lo anterior, los CNTs tienen la capacidad de servir como materiales estructurales multifuncionales y ser capaces de proporcionar el refuerzo estructural inicial necesario para lograr el andamiaje del tejido celular [19].

La modificación superficial de los nanotubos de carbono es la forma más clara de funcionalización; esta modificación proviene de procesarlos en la mayoría de los casos con diversos solventes, ya que los nanotubos al tener baja solubilidad en estos, obtienen grupos funcionales que le dan mayor estabilidad superficial en soluciones acuosas [1].

3.1.4.1 Funcionalización ácida

Un proceso de funcionalización que se considera biocompatible en los CNTs es cuando se llevan a una solución ácida, que por sus características se recomienda que sean ácido nítrico y sulfúrico en disolución 1:3 respectivamente en torno a 3M [67]; esta funcionalización genera grupos carboxílicos en los extremos y las paredes laterales de los MWNTs, como se esquematiza en la figura 5.

Este tipo de funcionalización permite controlar el tamaño de los CNTs, ya que dependiendo de las condiciones de temperatura, del tiempo de tratamiento y de la concentración de ácido empleada se puede lograr un acortamiento de la longitud de los nanotubos por degradación oxidativa de enlaces C-C con lo que se forman MWNTs más cortos, de mayor pureza y con una alta funcionalización con grupos oxigenados [48].

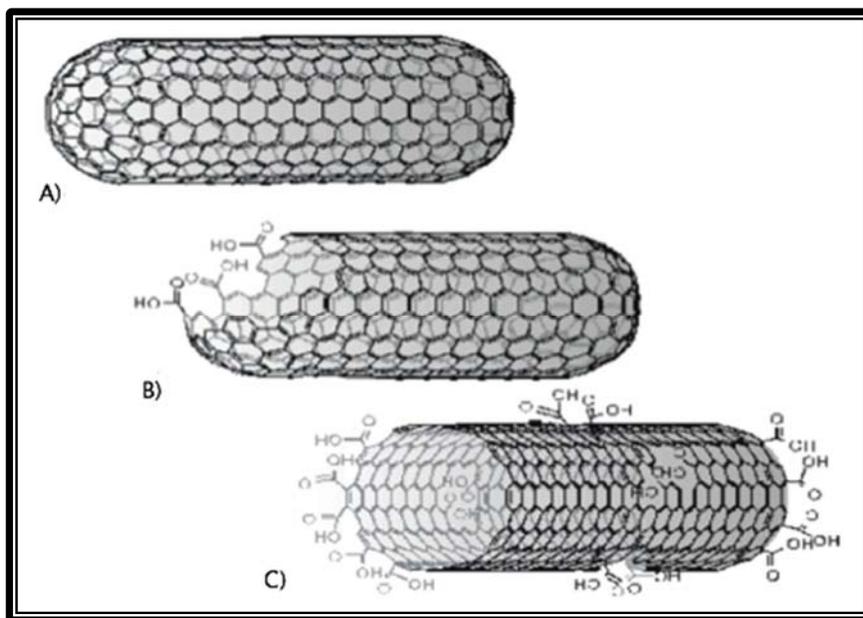


Figura 5. Proceso de funcionalización ácida. Fases en el proceso oxidativo mediante tratamiento ácido: A) Nanotubo con la estructura íntegra, B) oxidación inicial en las puntas y C) oxidación final, donde predominan los grupos carboxílicos en las partes centrales y extremos.

El tratamiento oxidativo produce la ruptura de las puntas de los MWNTs y por eso entre estos grupos funcionales el que predomina es el grupo carboxilo que se encuentran localizados principalmente en las puntas de los MWNTs (Figura 5C).

La funcionalización ácida también ha sido aplicada en películas de nanotubos crecidos previamente en cuarzo, que sin desprenderlos de éste, pueden formar una superficie apta para la interacción celular; los sustratos recubiertos con nanotubos se someten a solución ácida que crea fuerzas capilares y de tracción, que generan una tensión de dilatación hidrostática a la solución conduciendo al aplanamiento de los nanotubos. Cuando los nanotubos han colapsado desde direcciones opuestas se tocan entre las dos regiones de baja densidad, formando una estructura 3D en forma de polígonos con paredes perpendiculares al sustrato. Esta forma de andamiaje sirve para que las células se depositen sobre la superficie de la estructura 3D [19] (Figura 6).

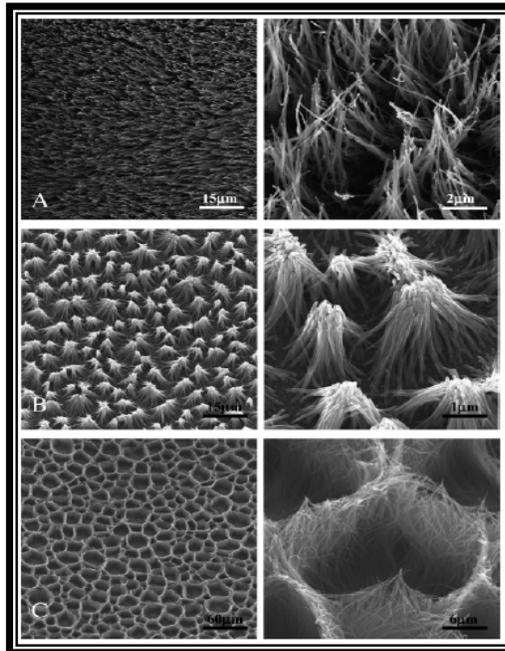


Figura 6. Estructuras 3D de CNTs crecidos perpendicularmente en trozos de cuarzo. Imagen de estructura 3D empleando microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy). En A) se muestra una cama de nanotubos de carbono alineados crecidos en cuarzo iniciando la acidificación. B) Proceso de unión hidrostática de los nanotubos después de un tratamiento de funcionalización ácido. C) Cavidades en forma de en forma de polígonos con paredes perpendiculares al sustrato obtenidas al final del proceso de funcionalización [19].

Dependiendo de la longitud de los MWCNTs alineados, es posible modular su distribución espacial. Por lo tanto, esta técnica se puede utilizar para crear pirámides como las estructuras (Figura 6 B) o cavidades interconectadas, con un volumen lo suficientemente grande como para albergar un tipo celular específico bajo investigación (Figura 6 C) [19].

3.1.4.2 Funcionalización con polímeros

La funcionalización de nanotubos de carbono, especialmente con polímeros hidrófilos o con bio-macromoléculas, puede mejorar su solubilidad en agua y la dispersión en los fluidos biológicos y por lo tanto disminuir el efecto de algunas fuentes de toxicidad [1].

Se han diseñado ya algunos nanotubos polimerizados, esperando respuestas que permitan su posterior uso en áreas biomédicas, como ejemplo se encuentra el caso del poliglicerol (PG) y PCA como polímeros hiperramificados altamente biocompatibles en la superficie de los MWNT para convertirlos en materiales hidrófilos y aumentar así la solubilidad de MWNTs en agua, disminuir su agregación, la polidispersidad de tamaños y por lo tanto disminuir su toxicidad [1], permitiendo una confiable aplicación en sistemas biomédicos.

Existen dos métodos para funcionalizar con polímeros.

“*Grafting to*” método, en el que un polímero que contiene un grupo funcional reactivo puede ser unido a un CNT funcionalizado por reacción química.

“*Grafting from*” método, en el que la polimerización de un monómero adecuado es iniciado desde sitios reactivos de CNTs [30].

3.1.4.2.1 Polimerización con PCA

La polimerización es un tipo de funcionalización que consiste principalmente en añadir un polímero hiper ramificado a la superficie de los CNTs, este proceso puede hacerse con mayor facilidad desde el “*Grafting from*”, que como se

mencionó anteriormente, es un proceso que se logra uniendo el polímero a cadenas de grupos funcionales previamente añadidos [30].

La polimerización con PCA [28], [29], [30], se inicia con la previa funcionalización ácida que logra en los MWNTs una adición de grupos carboxilo en la periferia [19] (Figura 5), permitiendo que al añadir el polímero se obtenga una interacción con la superficie como se esquematiza en la figura 7.

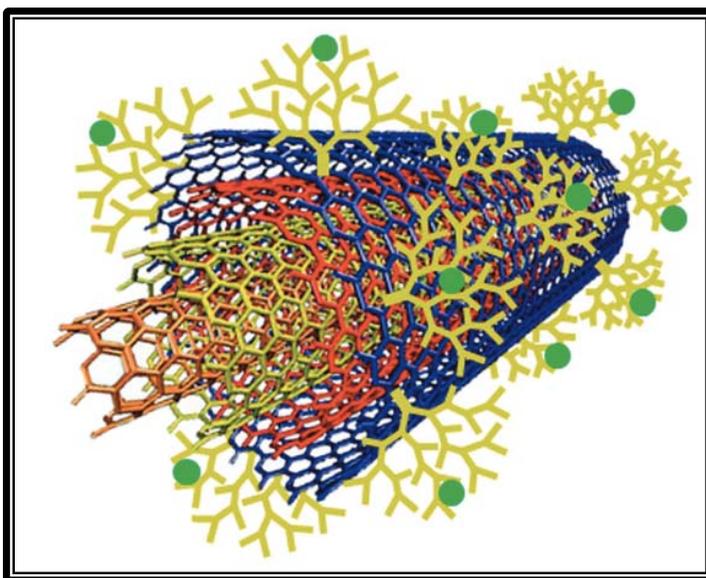


Figura 7. Polimerización con ácido poli-cítrico. Imagen representativa de la estructura final de un nanotubo de carbono multicapa polimerizado con PCA [1].

Durante la funcionalización de MWNTs con PCA, la conformación de los nanotubos puede cambiar de un estado lineal hacia un tipo circular debido a las interacciones secundarias entre PCA macromoléculas [1]. Sin embargo, dicha alteración no se ha encontrado en los resultados de caracterización de la presente investigación.

Una de las ventajas de esta polimerización es que no se utilizan otras partículas que permitan la unión entre los grupos carboxilo y las cadenas de polímero, sino que como se describe en la metodología, solo se lleva el polímero a altas temperaturas y en condiciones de vacío, logrando la reacción de esterificación y

con esto la unión del polímero a las paredes del nanotubo, evitando cualquier contaminación u oxidación [30].

Por otra parte, un biomaterial debe tener propiedades hidrofílicas que le permitan interactuar con un material biológico y evitar su agregación en un medio de cultivo [48]. El PCA es un polímero que por ser soluble tanto en agua como en otros disolventes orgánicos [30], puede ser utilizado en ensayos biológicos, además de que su composición química puede ser de fácil reconocimiento y reacción con los componentes de la célula [25].

3.1.4.2.2 Polimerización con biomacromoléculas.

La bio-funcionalización o funcionalización con bio-macromoléculas consiste en la adición de biomoléculas concretas para cada tipo de tratamiento que se desea investigar, dando como resultado una opción importante para diseño de biomateriales [25] [66]. En los métodos generales de bio-funcionalización, los CNTs puede ser modificados con cadenas de ADN, ARN, proteínas, etc, dando como resultado CNTs-bioactivos que pueden funcionar como biosensores, andamios, portadores de fármacos, etc [1] [25].

Otras de las biomoléculas más específicas que actualmente se utilizan con los nanotubos son por ejemplo: la albúmina de suero bovino, la inmunoglobulina, la peroxidasa, algunas caspasas, también hebras de ácido nucleico peptídico (PNA), entre otros [1] [4] [25] [66].

3.1.4.2.3 Otros polímeros

Existen varias experimentaciones con diversos tipos de polímeros, ya que cada uno puede aportar al sistema, diversas características que hacen que el linaje celular con el que interactúan responda de una manera concreta. Uno de los polímeros más utilizados actualmente es el polietilenglicol (PEG) [15], con el que se han generado resultados interesantes como los demostrados por Nayak *et*

a/[20], que al polimerizar los MWNTs con una película delgada de PEG (PEGylated MWNTs), influye en la proliferación y morfología de las células madre mesenquimales humanas (hMSCs), además de conducir a diferenciación final en osteoblastos, incluso en ausencia de agentes inductores bioquímicos.

Otros polímeros que han sido recientemente aplicados, son por ejemplo el polietileno tereftalato conocido como PET y el poliuretano conocido como PU, entre otros [6], [20], [26], [27].

El PET ha presentado resultados de cambios en la topografía de matrices fibrosas, permitiendo un significativo crecimiento de las células, mejorando su desempeño y anclaje en andamios de tejido 3D, también ha resultado una mayor diferenciación neuronal de células madre embrionarias de ratón (MES) [15]. Este par de ejemplos demuestran que los CNT y su ventajas en sustratos celulares 3D, pueden actuar en combinación con su resistencia mecánica, flexibilidad y baja densidad para resolver simultáneamente muchos inconvenientes comúnmente encontradas con dispositivos de implantación [1].

3.2. Células madre mesenquimales (MSC).

Las células madre adultas, son células con gran capacidad de diferenciación celular (Figura 8), que intervienen en la homeostasis tisular. Biológicamente, las células madre se caracterizan por su habilidad de auto renovación [68], no sólo por dividirse rápida y continuamente, sino también por crear nuevas células madre y células diferenciadas.

El proceso asimétrico de la mitosis permite intrínsecamente obtener dos células hijas. La célula se polariza, es por eso que determinadas moléculas están específicamente localizadas en un lado o polo dependiendo de su destino celular; después, el huso mitótico se alinea perpendicularmente hacia el eje polar de la célula teniendo al final del proceso dos células diferentes [69].

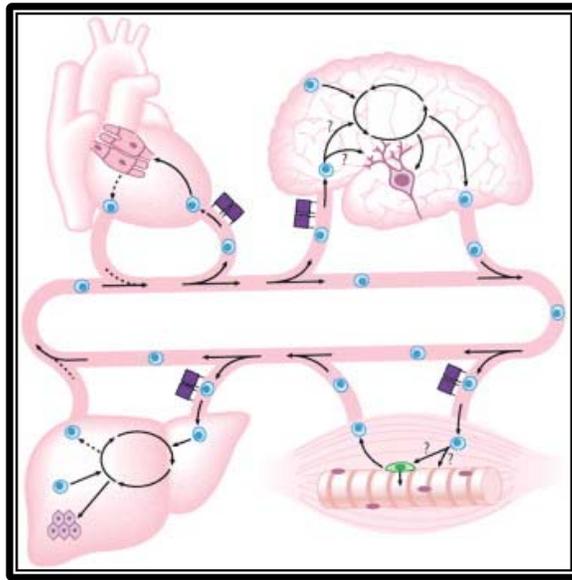


Figura 8. Potencial de diferenciación de las MSCs. Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales, mostrando las diferentes rutas y tipos de tejido que se pueden formar a partir de éstas [70].

3.2.1. Importancia de células madre mesenquimales en regeneración de tejido.

Desde el punto de vista fisiológico, una célula madre adulta mantiene la homeostasis del tejido cuando éste está parcialmente estable; cuando existe algún daño tisular se induce la regeneración de la zona lesionada por células madre [70], regenerando el tejido.

Sin embargo, se ha descrito que cuando el daño es mucho mayor a lo que el cuerpo podría regenerar, como es una lesión en la espina dorsal o un infarto del miocardio, estas células que se encuentran *in situ* son insuficientes en número y son incapaces de llevar a cabo una regeneración total de la parte tisular afectada, por ello se opta por la extracción de células madre adultas multipotentes, alojadas en otros tejidos, por ejemplo las células mesenquimales de médula ósea para poderlas llevar directamente a la zona del tejido dañada (Figura 8).

3.3. CNTs y células madre mesenquimales

Anteriormente se mencionaron algunas aplicaciones generales de los CNTs como nuevos materiales en el área biomédica [66]; estos nano materiales han abierto un horizonte extenso, ya que de acuerdo con las exigencias que cada aplicación se requiere que se pueda trabajar en un diseño concreto, como por ejemplo, en la modificación de CNTs que puedan silenciar genes, otros que tengan propiedades que puedan ser usados como biosensores, otros como nano inyectores de punta, incluso diseñar CNTs con características concretas que puedan tener interacciones con la superficie celular [1], [4].

3.3.1. Biocompatibilidad de MWNT y células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales juegan un papel significativo en el avance de la medicina regenerativa de los tejidos y órganos de reemplazo [71].

Estas células se encuentran en los tejidos adultos incluyendo el hueso y el tejido adiposo, como reservorios de células reparadoras y se diferencian en respuesta a la señalización de las heridas o enfermedades [71].

Algunas de las actuales investigaciones han encontrado que el nanotubo al hacer contacto con la membrana celular, interactúa principalmente con las glicoproteínas membranales antes de hacerlo con los lípidos, ya que las cadenas de la glicoproteína son más largas. Una vez que el nanotubo hizo contacto con estas moléculas, se pueden generar varias reacciones, una podría ser que los CNTs se queden en la periferia y otra reacción importante podría ser que por el tamaño del nanotubo, éste se introduzca a la célula por endocitosis [59].

El tamaño máximo que debe tener el nanotubo para ingresar en la célula, según algunos reportes, es de aproximadamente $1\mu\text{m}$ para citoplasma y 200 nm de longitud para el núcleo [64].

Contrariamente a la entrega de la carga espontánea utilizando nanotubos de carbono, estudios experimentales recientes han utilizado con éxito [72], [73] la

microscopía de fuerza atómica (AFM), utilizada para entregar las moléculas a las células empujando al CNT-cargado, a través de una membrana celular, lo que sugiere el uso de nanotubos de carbono como nano inyectores [72].

Hasta la fecha, el mecanismo de captación de CNTs espera consenso, ya que con algunos informes se indica que los nanotubos de carbono pueden entrar en las células mediante endocitosis [59], [74] mientras que otros afirman que los CNTs pueden someterse a inserción espontánea y difusión a través de la membrana celular [75], [76], [77]. Por lo tanto, si los CNTs se utilizan como sistemas de suministro, puede ser más eficiente que se transporte la carga fuera del tubo, ya que los lípidos de bloqueo del interior de la célula podrían impedir la entrega de carga interna.

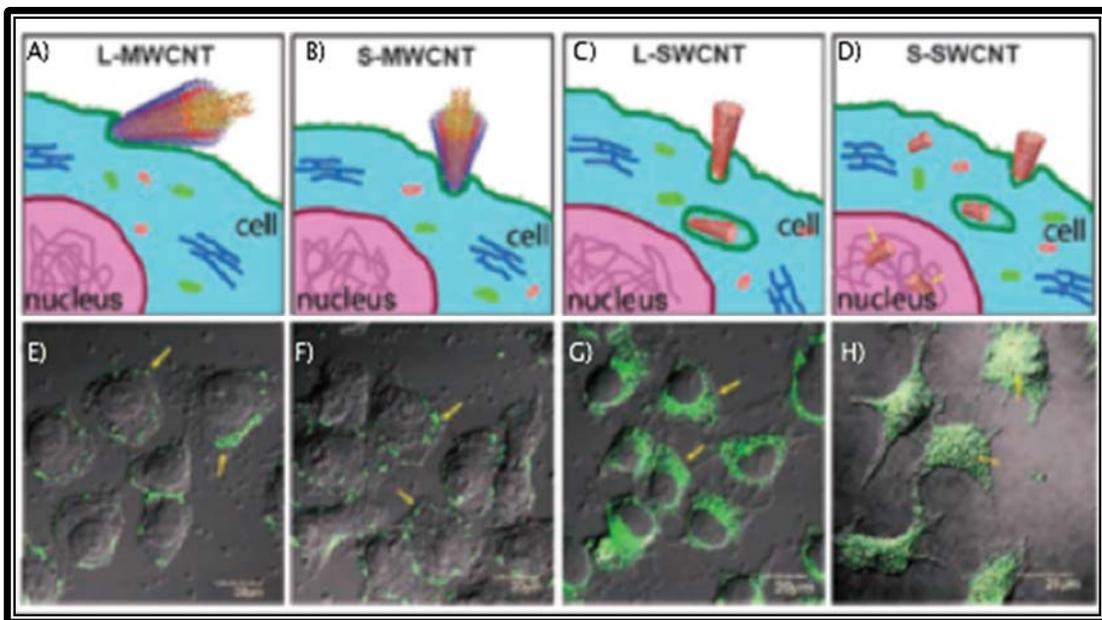


Figura 9. Mecanismo de Internalización de CNTs a nivel celular. En B) se muestra que los MWNTs son excluidos del interior, mientras que los SWNTs en D) pueden ser transportados hasta el núcleo. A) y C) representan nanotubos de carbono más largos teniendo mayor dificultad de entrar a la célula. E), F), G) y H) Imágenes de microscopía confocal que muestran por fluorescencia la localización de los nanotubos al penetrar o no en la célula [1].

Experimentos recientes afirman que el mecanismo de absorción de MWNTs es altamente dependiente de la longitud de los nanotubos, ya que aquellos que son más cortos que 1 μm son más fáciles de internalizar en las células [1] (Figura 9).

3.3.2. Andamiaje

Un foco de la investigación fundamental es el desarrollo de estructuras con propiedades y funcionalidades que imitan la matriz extracelular natural en una escala de tamaño similar. Materiales de andamiaje juegan un papel importante en la dirección de crecimiento del tejido y ofrecer oportunidades para manipular y controlar el comportamiento de células madre [6].

En particular, el dopaje de un polímero con un material conductor proporciona una conductividad eléctrica al andamiaje, que puede ser importante para facilitar la migración celular, la proliferación, deposición del calcio, expresión de genes que controlan procesos de diferenciación específica, etc [71].

Los MWNTs, por sus características anteriormente descritas, podrían ser considerados como excelentes soportes durante el crecimiento celular, sin embargo, estas aplicaciones que requieren interacción con un modelo biológico, advierten una mayor investigación para ofrecer mejores soluciones de biocompatibilidad [1]. Este hecho, posibilita la obtención de estudios más completos, tanto positivos como negativos, sobre las respuestas en parámetros biológicos como proliferación, apoptosis, morfología y diferenciación [15], [16].

Evaluar el posible riesgo que representa el uso de fCNT a nivel celular es muy importante ya que los nanotubos funcionalizados pueden hacer contacto con la mayoría de las moléculas de la matriz extracelular, sin embargo son las integrinas las que pudieran interaccionar con mayor facilidad [4]. Las integrinas forman parte de las moléculas de adhesión celular (CAMs: *Cell Adhesion Molecules*). Son proteínas de membrana formadas por dos cadenas, la alfa y la

beta. Participan en interacciones con proteínas CAMs de otras super familias en las que se requiere, en muchos casos, la participación de cationes divalentes como el calcio o el magnesio. Las integrinas pueden interactuar con componentes de la matriz extracelular y, a nivel intracelular, interactúan con proteínas que las conectan funcionalmente con el cito-esqueleto y proteínas que desencadenan cascadas de señalización como respuesta a un estímulo externo.

Estas rutas de señalización son integradas en la célula junto con otras señales, a veces procedentes de otros tipos de CAMs. Esta intrincada comunicación de redes puede dar una amplia gama de respuestas tan diversas y en ocasiones tan inesperada cuyas consecuencias se pueden ver reflejadas en fenómenos como: activación de proliferación, migración, diferenciación, y muchas veces en muerte celular. Es tan relevante la función de estas glicoproteínas membranales que su participación en procesos celulares básicos, hace que las CAMs sean fundamentales en procesos como la embriogénesis o la regeneración de tejidos.

De igual manera las Integrinas juegan un papel importante en la patogenia de múltiples enfermedades autoinmunes y en el desarrollo de metástasis en los procesos tumorales [78], lo cual nos lleva a pensar que tener un conocimiento profundo de la interacción CNT-célula por medio de este tipo de proteínas, nos llevaría a en un futuro este tipo de enfermedades pudieran ser blanco para el diseño de CNT con carácter curativo.

3.3.3. Citotoxicidad de CNTs

Para aplicar con éxito una nueva generación de nanomateriales en biomedicina, especialmente utilizados para andamiaje, todavía es necesario más investigación para lograr tener una información completa acerca de su toxicidad y comportamiento con el contacto celular.

Se ha descrito anteriormente que las propiedades físico-químicas de nanopartículas tales como el tamaño, la forma, carga superficial, la química de superficie, hidrofobicidad, rugosidad, rigidez y grado de composición pueden afectar la absorción y focalización a ciertos órganos, tejidos o células [1].

La toxicidad y la inmunogenicidad de los CNTs tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* se ha atribuido a diversos factores que se deben considerar para el diseño, tales como el número de paredes, la longitud, el área de la superficie, grado de agregación, el grado de oxidación, hidrofobicidad, topología de la superficie, método de administración, el tipo y grado de funcionalización, y el método de síntesis [1].

Una cuestión importante a considerar para evaluar el grado de citotoxicidad que pueden provocar los nanotubos de carbono ya sintetizados, es el tipo y cantidad de los catalizadores [3], es por esto, que es necesaria una etapa de purificación previa a su utilización en la industria biomédica ya que una de las consecuencias más graves sobre la citotoxicidad de los nanotubos sería la causa de cáncer [1], [3], [33].

3.3.3.1. Apoptosis

La apoptosis es una vía de muerte celular programada inducida mediante un programa de suicidio regulado de forma muy estrecha en el que las células destinadas a morir activan una serie de enzimas responsables de degradar el ADN nuclear, proteínas nucleares y citoplasmáticas mediante reacciones bioquímicas que se llevan a cabo de manera concatenada [79].

Las lesiones celulares suelen producirse por diversa vías, las mas comunes son:

- a. Cuando las células son sometidas a un estrés al que no pueden adaptarse.
- b. Cuando se exponen a agentes con capacidad lesiva inherente.
- c. Cuando presentan alteraciones intrínsecas.

En los 3 casos, las lesiones pueden progresar a través de un estadio reversible y en el que las células con su función normal o, si el daño es muy severo, se culmina en la muerte celular programada.

Recientemente, la apoptosis se ha sugerido como un evento potencial relacionado con efectos tóxicos inducidos por diversos nanomateriales, incluyendo los CNTs [80].

La toxicidad puede depender, como ya se mencionó con anterioridad, de diversas características de los CNTs como su pureza, superficie, dimensiones, etc. En investigaciones anteriores se menciona que la membrana de macrófagos humanos se puede dañar por MWNTs puros, lo cual lleva a pensar que sin funcionalización previa pueden ser tóxicos para ciertas células [81].

Los CNTs funcionalizados con carboxilación, reducen la producción de citocinas, inflamación pulmonar y fibrosis [81], por lo que la funcionalización es un factor determinante para la toxicidad.

3.3.3.2. Proliferación

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular [20], [26]. Cada tipo celular presenta una serie de receptores y factores de crecimiento característicos que regulan la proliferación celular y controlan la respuesta a tales factores. El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característico marcando con éste la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo ya que de él depende la homeostasis celular [16], [20].

Una de las formas para conocer la cantidad de células que están proliferando o iniciando un proceso de muerte celular es el ensayo con azul tripano, que es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras, por exclusión se cuentan

las células que no incorporan el colorante ya que éste, solo es capaz de entrar en células cuya membrana celular presenta alguna alteración y por ende es una célula dañada e inviable. Este método está basado en que las células vivas (viables) no captan el azul de tripano, mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Una vez que la muestra representativa del cultivo está lista, se lleva a conteo por medio de un hemocitómetro [22], enfocadas con un microscopio teniendo como muertas las células teñidas de azul y como vivas las refringentes.

3.3.3.3. Morfología

Cuando la célula ha sido afectada por factores externos o internos, es común que su morfología sufra algún cambio, lo cual indica una probable alteración que puede repercutir en su funcionamiento. Estos factores pueden ser lesiones leves o profundas que se reconocen como hinchazón de algún organelo, rotura de lisosomas, mitocondrias con densidades amorfas, rotura de membranas, cambios nucleares profundos, etc [9], [25], [37], [38].

Si la alteración es grave, se provoca o una inminente activación de muerte celular o la activación de otra ruta metabólica que estimule diversos factores de protección. Los CNTs, al ser un factor externo desconocido para la célula, previsiblemente pueden afectar las condiciones celulares, por lo que la prueba de morfología, utilizando un microscopio confocal, ayuda a examinar el aspecto de la célula [15] y con esto evidenciar qué tipo de lesión se produjo.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el análisis completo del comportamiento de células madre mesenquimales en contacto con nanotubos de carbono, primeramente funcionalizados y después polimerizados con ácido poli-cítrico, fueron necesarias una serie de experimentaciones que comprobaran, que tanto las MSCs como los CNTs, fueron tratados de tal manera que se pudieran cumplir los objetivos planteados en un inicio.

Los nanotubos de carbono que se sintetizaron para este trabajo de investigación, fueron completamente caracterizados para poder darles diferentes tratamientos, demostrando que el efecto de funcionalización y polimerización de ácido poli-cítrico (PCA) en los CNTs a diferentes concentraciones, permite analizar comportamientos detallados de las MSCs.

Las MSCs, como se mencionó anteriormente, son un modelo celular genéticamente inalterado lo que permitió evaluar comportamientos celulares con mayor facilidad, facilitando información de viabilidad celular, apoptosis y por microscopía confocal, evaluando con esta última, la morfología celular y la presencia de nanotubos de carbono tanto al exterior como al interior de la célula.

4.1. Síntesis de CNT

El método concreto que se utilizó para crecimiento y síntesis de nanotubos en esta investigación fue el CVD térmico, para el cual es necesario tener como fuente de carbono una mezcla de tolueno y ferroceno, siendo este último el que aportará las partículas catalizadoras. Estos dos compuestos reaccionan químicamente hasta lograr una mezcla homogénea, ésta se lleva a un aumento de temperatura tal, que logra que las partículas de catalizador se evaporen y se fijen en la pared del tubo de cuarzo, permitiendo que las nanopartículas del gas

se depositen atomísticamente en él y comience el crecimiento de los nanotubos de carbono [15].

Existe una gran cantidad de Fe contenido en la mezcla, por lo que se propicia el crecimiento de nanotubos de carbono directamente en la pared del tubo de cuarzo.

4.1.1. Síntesis de Nanotubos de Carbono multicapa (MWNT) y dopados con Nitrógeno (CNx)

Los MWNTs y CNxs, se sintetizaron por deposición química de vapor (CVD) siguiendo procedimientos similares a los reportados por A. Botello, *et al.* [27]. El proceso se realizó utilizando como precursor una mezcla de ferroceno/tolueno (3,5 / 96,5% en peso) para los MWNTs o de ferroceno/bencilamina (3,5 / 96,5% en peso) para los CNxs, estas mezclas se colocaron como materia prima en la cámara de pulverización en spray (Pyrosol 7901, Francia) a una velocidad de flujo de Ar de 2,5 l/min.

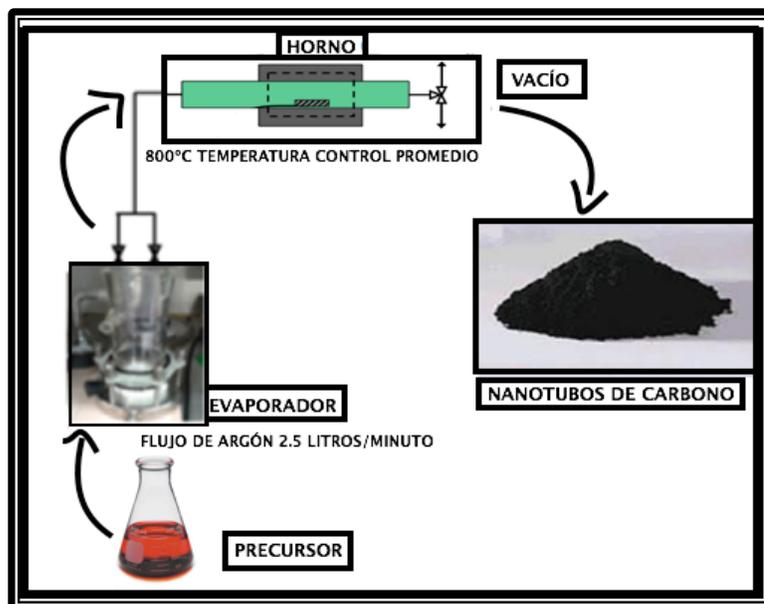


Figura 10. Sistema estándar de síntesis de nanotubos de carbono. Mediante el método de CVD, se emplea una solución precursora ya sea benzilamina, tolueno o ferroceno, dependiendo del nanotubo que se quiera obtener, se coloca en el evaporador y una vez que la mezcla se encuentra en fase gaseosa entran las micropartículas al horno para logra el crecimiento de nanotubos. Al final del proceso los nanotubos se obtienen en fase sólida en aspecto de polvo negro.

Estas mezclas proveen las nano-gotas de Fe, C y N que llegan después bajo un flujo de Ar a 0,2 l/min a un horno tubular donde se coloca un tubo de cuarzo que se calienta hasta alcanzar 850°C, después, estas partículas se fijan en las paredes del tubo de cuarzo permitiendo el crecimiento de nanotubos. Luego de 15 minutos de reacción CVD, el sistema se enfría a temperatura ambiente para poder retirar los CNT obtenidos del reactor (Figura 10).

4.1.2. Síntesis de MWNTs y CNx en trozos de cuarzo

Esta experimentación se realizó con el objetivo de diseñar una especie de cama 3D de nanotubos (Figuras A7 y A9), para después someterla a tratamiento ácido y lograr algo similar a lo que se muestra en la figura 6; para esto, fue necesario el proceso de síntesis descrito anteriormente, con la particularidad que antes de montar el equipo se colocan trozos de cuarzo de aproximadamente 1 cm² a la mitad del tubo, es decir en la zona de alta temperatura, para que ahí se fije la partícula catalizadora y crezcan los nanotubos de carbono. Ver figura A2 en anexos. Este diseño de cama 3D no se llevó a tratamiento con MSCs, debido a que cuando se colocaron en ácido, gran cantidad de nanotubos se desprendieron del cuarzo.

4.2. Funcionalización ácida de MWNTs y CNx

Después de la síntesis de los dos tipos de CNTs, de manera independiente se colocaron 0,6 g de cada CNT en viales de vidrio de 100 ml para iniciar el proceso de funcionalización [82] en una solución de ácido de H₂SO₄ / HNO₃ 3: 1 por 3M [19], para después ser sonicados a 750 W y 20 kHz) durante 4 horas [83]. La solución se filtró al vacío y se lavó con NaOH 3M y después con agua bi-destilada, obteniendo (fCNT). Una vez que los nanotubos se funcionalizaron se caracterizaron para conocer las propiedades tanto de fMWNTs como de fCNxs. Una muestra de cada tipo se separó para su posterior polimerización, y con otra se prepararon soluciones a 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml en agua bi-destilada, una vez preparadas se colocaron en el sonicador durante 4 horas [83],

para una mayor dispersión y poder así utilizarlos en las pruebas biológicas.

4.3. Polimerización con ácido poli-cítrico en fMWNT y fCNx para obtener PMWNT y PCNx.

Un total de 0,1 g. tanto de fMWNT como de fCNx obtenidos en el proceso de funcionalización anterior, se añadieron de manera independiente a un matraz de fondo redondo, simulando el equipo de polimerización, éste se fijó en un baño de agua con agitador magnético y una entrada de vacío. Cinco gramos de ácido cítrico monohidratado fueron añadidos al matraz sellado posteriormente al vacío. La mezcla se calentó hasta 100 °C y se agitó a esta temperatura durante 30 min. Después de retirar el agua evaporada con una línea de vacío, la temperatura de reacción se elevó a 140 °C y se agitó a esta temperatura durante 1 h. Una vez más, el agua producida se separó por la línea de vacío, y la temperatura de reacción se elevó a 160 °C [30]. El ácido cítrico polimerizó los fMWNTs y fCNxs a través de una reacción de poli-condensación.

La polimerización se continuó en esta temperatura bajo vacío dinámico durante 1,5 h. siguiendo un procedimiento similar reportado por V. Sarlak, *et al* [28]. Debido a la baja solubilidad de los fCNTs y del ácido cítrico en los disolventes orgánicos, la esterificación es el mejor método para una reacción de poli-condensación entre fCNTs y ácido cítrico [29], [30]. Se utilizó ácido cítrico monohidratado para evitar el problema de descomposición ya que el punto de fusión del ácido cítrico es 100 °C. A esta temperatura, usando el monohidratado, se obtuvo una reacción de poli-condensación parcial entre PCA y fMWNT y fCNx; después de retirar el agua y aumentar la temperatura se produce la unión entre el ácido poli-cítrico hiper-ramificado y los fCNTs, obteniendo los PCAylated-fMWNT (PMWNT) y PCAylated-fCNx (PCNx) respectivamente. Para la purificación de nanotubos obtenidos se dejó enfriar la mezcla, ésta se disolvió en acetona y después el producto se dejó precipitar en agua bi-destilada, se retiró el agua mediante filtración al vacío. Finalmente, para las pruebas biológicas también se

prepararon soluciones de PMWNT y PCNx a 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml usando agua bi-distilada en un sonicador durante 4 horas.

4.4. Caracterización de CNT

La caracterización de los cuatro tipos de CNT fue hecha utilizando distintos instrumentos. Para la caracterización morfológica se usó un microscopio electrónico de barrido Dual-Beam (SEM, Nova 200 Nanolab, USA), para realizar la espectrometría de dispersión de energía (EDS), utilizada para la detección elemental. La estimación cuantitativa del porcentaje de elementos atómicos se hizo con el método ZAF (ZAF, *Atomic number, absorption and fluorescence*) en el EDAX EDS Genesis software.

Con un microscopio electrónico de transmisión (TEM, Tecnai G2 F30 S-TWIN, UK) se analizó la estructura de los CNT y con estas mismas se hizo la evaluación estadística de los diámetros se llevó a cabo en las muestras de fMWNT, fCNx, PMWNT y PCNx, obteniendo las medidas como se muestra en la figura A8.

El análisis Raman fue realizado con un instrumento (Horiba Jobin Yvon, Labram HR800, France) a 633 nm de longitud de onda. El espectro infrarrojo (IR) se examinó en un espectrómetro FT-IR (Thermo Scientific, Nicolet iS5 ID5 ATR, USA). La caracterización termo-gravimétrica (TGA, *Thermogravimetric analysis*) se hizo en un (Q500, USA) bajo un flujo de N₂ a 50 ml/min siguiendo el siguiente método: modulación de la temperatura ambiente a 15 °C por 6 minutos, calefacción isotérmica a 100 °C durante 30 min seguido de un incremento térmico de 15 °C a 200 °C en 90 min con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

4.5. Cultivo celular

Para realizar el cultivo celular *in vitro* de MSCs se requirieron condiciones de temperatura y mezcla de gases apropiada, para que se pudieran generar los diferentes fenotipos que se buscan. Este tipo de células crecen en cultivos

celulares adherentes, es decir, que colocando sustratos concretos en las cajas Petri, las MSC pueden crecer en plástico y aumentar sus propiedades de adhesión, proporcionando otras señales necesarias para el crecimiento y diferenciación [10] [12].

4.5.1. Extracción

Las células mesenquimales procedentes de medula ósea se aislaron de ratas tipo Wistar, las cuales fueron mantenidas y crecidas previamente en el bioterio de la Universidad Panamericana de la Facultad de Ciencias de la Salud, después se sacrificaron en una cámara de CO₂ y, ya sin vida, antes de extraer los fémures, se les rasuró desinfectándola con alcohol y benzal para evitar contaminación.

4.5.2. Obtención in vivo de la médula ósea

Con técnicas de asepsia y antisepsia, manualmente se retiraron los huesos de la rata, haciendo una incisión en el abdomen para después dirigirse a la zona de fémur y tibia hasta dejar expuesta el área de tejido óseo [10], los huesos se colocaron en un tubo cónico de 50 ml que contenía una solución de PBS IX y antibiótico [12]. La muestra de tejido óseo se manipuló dentro de un ambiente controlado en una cámara de flujo laminar, ahí se procedió a retirar todo el tejido muscular hasta que quedara el hueso limpio sin dejar de humectar con buffer de sulfato salino 1M (PBS, *Phosphate Buffered Saline*). Una vez obtenido el hueso sin residuos musculares, se trituraron en pequeños trozos y se colocaron en una caja Petri con 9 ml de medio de cultivo (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), más 0.375 ml de tripsina y 0.100 ml de antibiótico (AB, *antibiotic*). Con el efecto de la tripsina se rompen enlaces peptídicos que permiten el desprendimiento del tejido unido al hueso. Finalmente se dejaron refrigerando durante 16 horas.

Pasado el tiempo requerido, la muestra se llevó a temperatura ambiente y se trató con 0.750 ml de colagenasa a una concentración de 2 mg/ml.

Se resuspendieron las muestras 10 veces y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml. La muestra sellada con parafilm, se llevó a la incubadora a 150 rpm de agitación y 37°C por una hora aproximadamente hasta que los huesos se veían relativamente blancos, indicando con esto que la colagenasa había degradado por completo el tejido adosado internamente al hueso.

Una vez retirados todos los residuos del hueso, para inactivar la colagenasa se resuspendieron en 5 ml medio de crecimiento DMEM para inactivar + 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) + AB.

Se centrifugó a 3500 rpm por ser un tubo de 50 ml durante 7 min, después se desechó el sobrenadante obteniendo así el botón celular de color rojo (residuo sanguíneo).

En el botón celular se colocó en 5 ml de buffer de lisis membranar (Lysis Buffer) dejándolo de 1 a 3 minutos en contacto con las células y después se afora a 15 ml con PBS 1X.

La solución resultante, se centrifugó a 2100 rpm durante 7 min, de este tratamiento se siguió con la incubación, colocando en 4 cajas Petri muestras de la solución con 5 ml de medio DMEM + SFB + AB, manteniéndolas a 37°C/5% CO₂ en el medio de crecimiento. Después de 24 horas, se retiró el cultivo de las cajas y se colocaron en 2 tubos cónicos, se centrifugaron y se cultivaron las células de sobrenadante.

El botón obtenido de sobrenadante se resuspendió en DMEM + SFB +AB y se incubó también. De las cajas Petri a las que se les retiró el medio para obtener sobrenadante, se tiene células que se fijan en la caja Petri y se lava con PBS 1X para eliminar residuos [5], [9], [10], [12].

4.5.3. Cultivo celular *in vitro*

Las MSC se aislaron y clonaron a partir de un cultivo heterogéneo derivado de médula ósea de rata, sembrando suspensiones de 10^4 células en cajas Petri de 30 cm² con medio α -MEM (Sigma-Aldrich, USA) [9], [10], [19], suplemento de suero fetal bovino (10%), penicilina (10,000 U), estreptomicina (10 mg/mL) y anfotericina B (25 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA). Después, el cultivo fue incubado a 37 °C y 5% de CO₂ utilizando tres tipos de concentraciones de fMWNT, PMWNT, fCNx y PCNx, *i. e.* 10, 100 y 1000 ng/ml.

4.6. Proliferación

Pasado el tiempo establecido para conteo, se retira el medio, se coloca tripsina para despegar las células del plástico, recuperarlas para su posterior centrifugación a 2000 rpm durante 5 min. Después de la preparación de cultivos celulares, se realizó una prueba de exclusión con azul de tripano (TBET) [22] a 0, 24, 48, 72 y 144 horas. Las células se tripsinizaron y se re-suspendieron en medio de cultivo fresco. Finalmente las células se contaron en un hemocitómetro. La prueba de proliferación celular se realizó por triplicado.

4.7. Ensayo de Apoptosis

Las células tratadas a diferentes concentraciones (10, 100 y 1.000 ng/ml) de fMWNTs, PMWNTs, fCNx y PCNx con MSC crecidas durante 48, 72 y 144 horas, se tripsinizaron y re-suspendieron usando un *kit* de ensayo de yoduro de AnexinaV/propidio (ellEvent®, USA). Las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfato salino y de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) y se incubaron a temperatura ambiente con una solución de anexina-V-FLUOS y yoduro de propidio (PI) durante 30 min similar al procedimiento reportado por Y. Jiang, *et al.* [81].

Las células fueron luego analizadas por citometría de flujo, el control de la emisión de fluorescencia fue a 395/525 nm para anexina V-FITC y 483/659 nm

para PI en un citómetro de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson, USA). Las células se sembraron por triplicado y como control puro se tomaron las MSC sin tratamiento de CNT y para el control positivo se tomaron muestras de MSC sin CNT pero con 25, 12.5 y 2.5 μ l de peróxido de hidrógeno, respectivamente.

4.8. Confocal

Se tomaron las muestras a 100 ng/ml de cada tipo de nanotubos después de 72 horas de tiempo de incubación, colocando en las cajas Petri un cubreobjetos para después fijar las células crecidas, una vez retirada la muestra se lavó con PBS y se fijaron con 4% w/v de paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, USA), se realizó también una tinción nuclear de inmunofluorescencia con Draq7 (bio status). La presencia de CNTs fue revelado por auto-fluorescencia utilizando un haz menor a 488 y un filtro de emisión 505-30 LB, mientras que los núcleos se observaron también en 488 y 633 LB. Las imágenes fueron capturadas usando una microscopía confocal (Zeiss, Alemania) y analizados por el software Zen 2009 y un microscopio confocal (Leica Mod. 8x TCS sp) que cuenta con el software LAS AF 3.3.0.

4.9. Estadística

Se realizaron tres repeticiones independientes de cada experimentación biológica. Los datos se expresan con la desviación estándar media de los experimentos. El análisis estadístico se realizó por varianza (ANOVA). La significancia estadística se infirió a $p < 0,05$, esto significa que el porcentaje de error cada vez que se realiza la misma experimentación es del 5%.

Una vez realizada la experimentación de cada etapa, se prosiguió a analizar los resultados comparando cada muestra con su control para poder hacer un análisis más completo.

De manera más puntual en el capítulo siguiente se podrá observar que la presencia de CNTs tanto polimerizados con PCA (PCNT) como funcionalizados

(fCNT) interactuando con MSCs, si alteran los procesos celulares de proliferación, apoptosis, incluyendo la modificación de la morfología. Además de comprobar que los fCNTs sin dopar (fMWNTs) presentaron el mayor efecto de proliferación, los PCNTs sin dopar (PWNTs) presentaron la menor cantidad de células muertas por apoptosis, sin embargo, los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno funcionalizados (fCNx), tuvieron la mayor actividad apoptótica.

También se podrá ver que los resultados de captación celular abren un panorama amplio para diferentes y nuevas aplicaciones.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los nanotubos de carbono, al entrar en contacto con las MSCs pueden originar respuestas celulares tanto positivas como negativas. Para entender las causas de estas respuestas, es necesario conocer las propiedades que ambos sustratos presentan. Lo anterior es importante ya que uno de los mayores problemas en el diseño de biomateriales, es descubrir si estos pueden asociarse a efectos citotóxicos como consecuencia ya sea del tipo de síntesis, proceso de funcionalización utilizado, polímero y linaje celular elegido, entre otros.

A continuación se presentan los resultados obtenidos tanto de la caracterización de CNTs como del manejo de MSCs para favorecer con esto su análisis e interacción abriendo nuevos y específicos campos de estudio.

5.1 Caracterización de CNT

La morfología y estructura de fMWNT, PMWNT, fCNx y PCNx, se muestra en la micrografía de la figura 11, apoyada con micrografías en la sección de anexos (Figuras A3, A4, A5 y A6), donde se muestra la morfología antes y después de la funcionalización. La medida del diámetro está reflejada tanto en la micrografía de la figura A9 como en porcentaje (Tabla 1), lo que sugiere que al tratarlos con PCA los fMWNTs aumentaron un 30% y los fCNxs un 50%, un poco más anchos que los reportados por M. Terrones, *et al.* [14].

Las micrografías de TEM en la figura 11 b) y f) muestran un cierto grado de desorden en las paredes exteriores de los CNTs debido al tratamiento ácido, este resultado fue comprobado por la información espectroscopia del infrarrojo (IR) (Figura 13), indicando la presencia de grupos funcionales carboxilo, generados durante la funcionalización de ácido [82], [83].

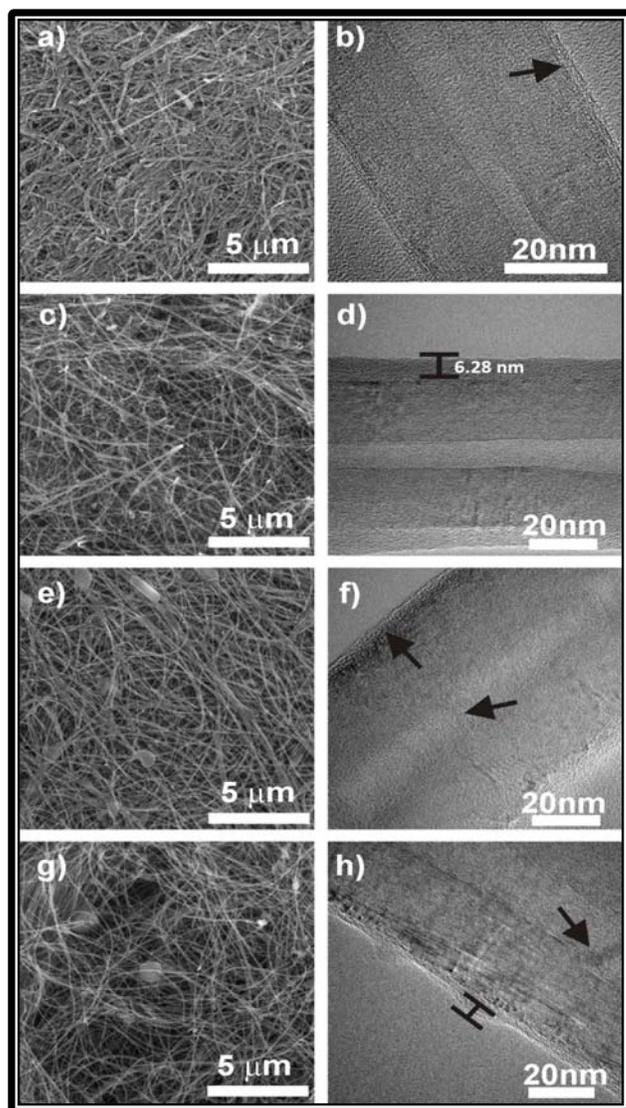


Figura 11. Caracterización por SEM/TEM de CNTs funcionalizados y polimerizados. Micrografías representativas SEM/TEM de fMWNT en (a, b), PMWNT en (c, d), fCNx en (e, f) y de PCNx en (g, h). Las flechas negras en (b) muestran la pared funcionalizada del CNT, mientras que las flechas blancas en (f, h) indican la típica estructura de bambú de los CNx. También se indica la película delgada de PCA en la estructura de los MWNT en (d) y de los CNx en (h).

Un diferente tipo de trastorno también es notable por las estructuras de bambú en la parte interior de los nanotubos de carbono como se muestra en la figura 11 f) y h), lo que indica la presencia de nitrógeno como agente dopante [14]. Durante la síntesis de CNx, el nitrógeno tiende a incorporar pentágonos en la estructura hexagonal del nanotubo, que afecta a su cristalinidad y la curvatura

de la superficie interior, generando la forma de estructuras tipo bambú en el interior [84] [85]. En la actualidad los CNxs están siendo investigados ya que los efectos de estas irregularidades pueden favorecer la interacción con polímeros [14].

La polimerización de los nanotubos de carbono con PCA es notable en la figura 10d) y h), donde una fina capa de polímero cubre los CNTs correspondientes, similares a los reportados por Y. Jiang, *et al.*[81].

Las composiciones elementales para cada uno de los cuatro tipos de nanotubos de carbono se muestran en los espectros EDS de la Tabla 1, lo que confirma que los nanotubos no contienen porcentaje en peso suficiente de contaminantes que puede causar citotoxicidad [14], [23]. Las nanopartículas de Fe se encuentran dentro de los CNTs, y por lo tanto no se encuentran en contacto con el medio ambiente, es decir, no interactúan con las MSCs, evitando probabilidad de citotoxicidad por Fe. Como ya se mencionó en el resumen y marco teórico, la funcionalización se ha utilizado para eliminar la mayor parte de las nanopartículas de catalizador u otros compuestos que están en contacto con los CNTs durante el crecimiento [1].

Los espectros de Raman en la figura 12a) muestran datos de rendimiento sobre los tipos de nanotubos y su defectos [1]. Las impurezas y defectos de los nanotubos de carbono son generalmente entendidos sobre la base de la banda de D alrededor de 1350 cm^{-1} , según lo informado por V. Datsyuk, *et al.* [86], donde la intensidad (I) de la banda D está relacionada con la cantidad de concentración de defectos. En contraste, la banda G se asocia tanto con la estructura de grafito como con la estructura cristalina de los tubos, encontrados a 1588 cm^{-1} . La relación I_G/I_D ha sido obtenido para los cuatro tipos de nanotubos con el objetivo de relacionar los defectos y la cristalinidad de los tubos, diferenciando con esto entre un nanotubo puro y uno dopado con nitrógeno. Por otro lado, se observa también que la funcionalización y polimerización aumentan la cantidad de

carbono desordenado, causada por la destrucción parcial de fMWNTs y fCNxs durante la exfoliación de las fibras y el tratamiento de polimerización [85], [87].

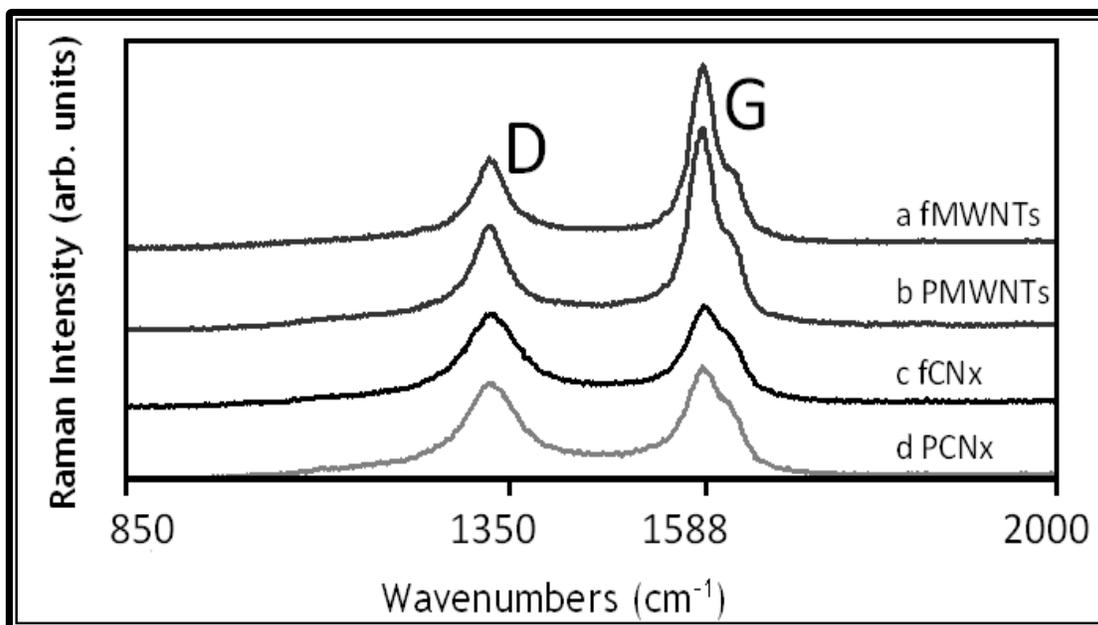


Figura 12. Espectro Raman. Espectros Raman de nanotubos de carbono usando una excitación lineal de láser a 633 nm. D y G, bandas que aparecen en todas las muestras a 1350 cm^{-1} y 1588 cm^{-1} respectivamente. La relación I_D/I_G en la oxidación durante la funcionalización en 12 a) y c) y durante la polimerización en 12b) y d), muestra mayor eficacia para los CNx ya que contienen mayor grado de impureza en su estructura, información sustentada en Tabla 1.

La intensidad de las bandas D y G es casi constante para los MWNTs y para los CNxs respectivamente (Figura 12); *i. e.* sólo un pequeño cambio en la relación I_D/I_G aparece cuando se polimerizan los nanotubos funcionalizados. Como era de esperar, fMWNTs y PMWNTs muestran una mayor intensidad en el banda G en comparación con los fCNxs y PCNxs. La relación de I_D/I_G de fMWCNTs y fCNxs fue de ≈ 0.41 y ≈ 0.89 respectivamente, mientras que la proporción de PMWNTs y PCNxs son ≈ 0.43 y ≈ 0.82 respectivamente (Tabla 1), resultados derivados del mecanismo de la oxidación durante la funcionalización, más eficaz para el exterior en las paredes de los CNxs.

Las composiciones químicas de los 4 tipos de nanotubos se confirmaron adicionalmente por espectroscopia IR (Figura 13).

Todas las muestras presentan las principales bandas de absorbanza entre 1750 y 2200 cm^{-1} relacionados con enlaces C-C de la estructura de la CNT. Mientras que un aumento en la intensidad de esta banda se encuentra en la Figura 13b) y d), debido a los enlaces de polímero. Los grupos carbonilo de las bandas de OH, obtenidos a partir de la funcionalización, están marcados ligeramente en 2500 cm^{-1} en las 4 muestras.

Tabla 1. EDS, diámetro y relación I_D/I_G de los CNTs caracterizados. Datos de los cuatro tipos de nanotubos incluyendo: el porcentaje en peso de C, N y Fe estimado por el EDS, se muestra también el diámetro aproximado de los nanotubos de carbono obtenidos por SEM y la relación de I_D / I_G por espectroscopia Raman.

	(wt% C)	(wt% O)	(wt% N)	(wt% Fe)	Diameter (nm)	I_D / I_G
fMWNTs	94.98	2.6	-	2.44	≈ 90.1	0.41
PMWNTs	93.96	4.23	-	1.81	≈ 117.8	0.43
fCNx	92.48	3.3	2.84	1.38	≈ 61.9	0.89
PCNx	93.22	3.82	1.01	1.94	≈ 92.6	0.82
METHOD	EDS-SEM	EDS-SEM	EDS-SEM	EDS-SEM	SEM	RAMAN

Las anchas bandas de absorbanza de PMWNTs y PCNxs (Figura 13b) y c)) , en torno a 3200 y 3500 cm^{-1} , se relacionan con el OH asociado a los hidroxilo de grupos funcionales ácidos y alcohólicos del polímero [30], [32].

Después de las caracterizaciones SEM, TEM y Raman, se confirmó la estructura de los nanotubos funcionalizados y polimerizadas, los resultados de IR se muestran en la figura 13, consistente con otros estudios [30], [31], [32]; confirmando que fue adecuada la funcionalización y la polimerización realizada en los nanotubos de carbono utilizados en este experimento.

Además, los datos de análisis termo-gravimétrico (TGA) (Figura A1) indican que la cantidad de grupos de ácido carboxílico y el PCA unido a los CNTs no cambian ni se desprenden con el aumento de temperatura; todas las muestras estuvieron en mantenimiento a un peso constante en un intervalo de 15 °C a 200 °C con sólo un 1% de variación, en consonancia con J. Vicente, *et al.* [82]. Teniendo en cuenta que la temperatura requerida para los experimentos biomédicos es entre 25 y 45 °C, los resultados de TGA aseguran que, si por alguna razón hay fluctuaciones de temperatura durante el proceso, la conformación química de los CNTs no se verá afectado.

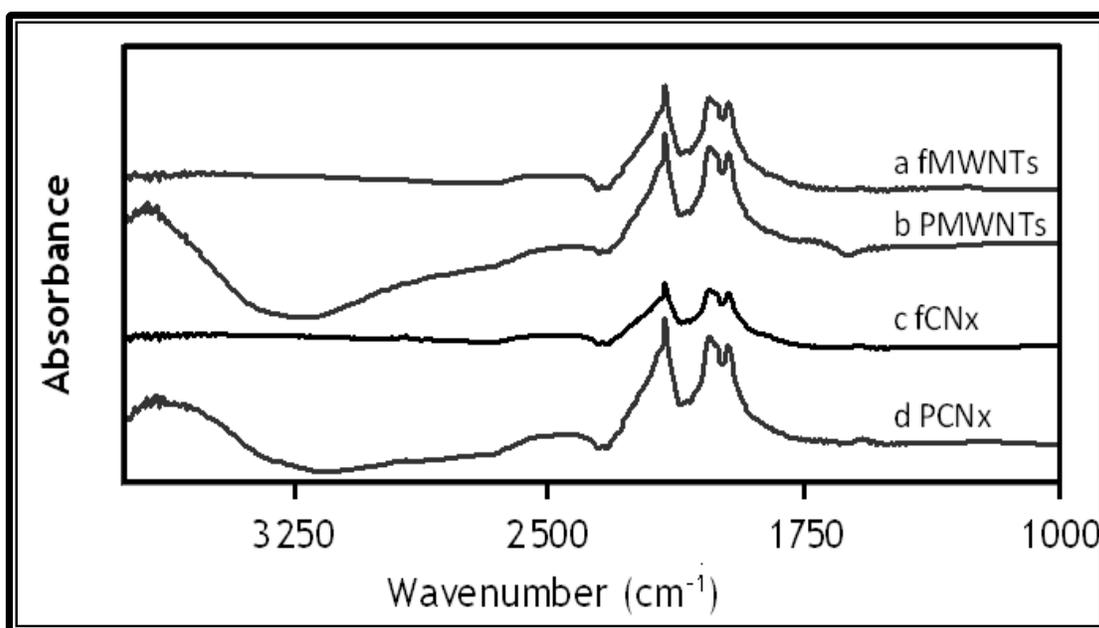


Figura 13. Espectro IR de los CNTs caracterizados. Los espectros infrarrojos de (a, c) corresponden a los MWNT y CNx funcionalizados con ácido, mostrando bandas comprendidas entre 1750 y 2200 cm^{-1} que se relacionan con enlaces C-C, mientras que la banda en 2500 cm^{-1} corresponde a los grupos OH obtenidos por funcionalización. Para los CNTs polimerizados, (b, d), la banda ancha en 3600 cm^{-1} se relaciona con los grupos OH asociados al PCA.

Una vez que se caracterizaron las diferentes muestras de CNTs, se procedió a llevar a cabo los ensayos biológicos con células de cultivo primario extraídas de hueso de rata derivada de la médula (MSC).

5.2 Efectos biológicos de CNT en células mesenquimales

5.2.1 Proliferación celular

El efecto sobre la proliferación celular de las MSCs a diferentes concentraciones de CNTs se muestra en la figura 14. A los 10 ng/ml (Figura 14a) el resultado de proliferación más significativo a esta concentración fue en los fMWNTs, que comparado con el control la cantidad de células a las 48 y 72 horas casi se duplica. Los PMWNTs a 10 ng/ml muestran menos proliferación, teniendo un comportamiento similar al control a las 48 y 72 hrs. En contraste fCNx y PCNx a 10 ng / ml no muestran capacidad proliferativa.

En una mayor concentración, 100 ng/ml (Figura 14b) , fMWNTs y PMWNTs presentan un comportamiento de alto crecimiento proliferativo, especialmente a las 144 horas. En contraste, fCNxs y PCNxs permanecen con una capacidad proliferativa más baja que la muestra de control en todo momento. Utilizando la concentración más alta, 1,000 ng/ml, (Figura 14c) fue notable que la proliferación celular no fue posible en ninguna muestra, con la excepción de la de control. Los resultados del análisis de proliferación para fMWNTs y PMWNTs, difieren con el comportamiento reportado por Y. Jiang, *et al.* [81], ya que al usar PEGylated-MWNT en un modelo de macrófagos, tuvo más respuesta proliferativa con el polímero al contrario que lo obtenido en el presente trabajo, teniendo mayor tasa de proliferación en la muestra de fMWNT.

5.2.2 Apoptosis

Como se ha mencionado a lo largo del presente trabajo, la apoptosis juega un importante papel para determinar si es viable el uso de cualquier biomaterial en contacto con células, específicamente cuando se sabe por investigaciones anteriores que los CNTs funcionalizados por carboxilación, reducen la producción de citocinas, provocan inflamación pulmonar y fibrosis [81]. Ante esta posibilidad de reacción, es necesario un análisis completo de las muestras utilizadas,

esperando un resultado similar a lo reportado en las muestras de fMWNT y fCNx; no así con los nanotubos polimerizados, que por poseer moléculas más largas y similares a la matriz celular, se prevé un menor porcentaje de apoptosis.

El estudio de citometría de flujo realizado en este trabajo proporciona datos sobre la muerte celular por apoptosis cuantificando la anexina V (producto de la destrucción de la membrana plasmática en células apoptóticas).

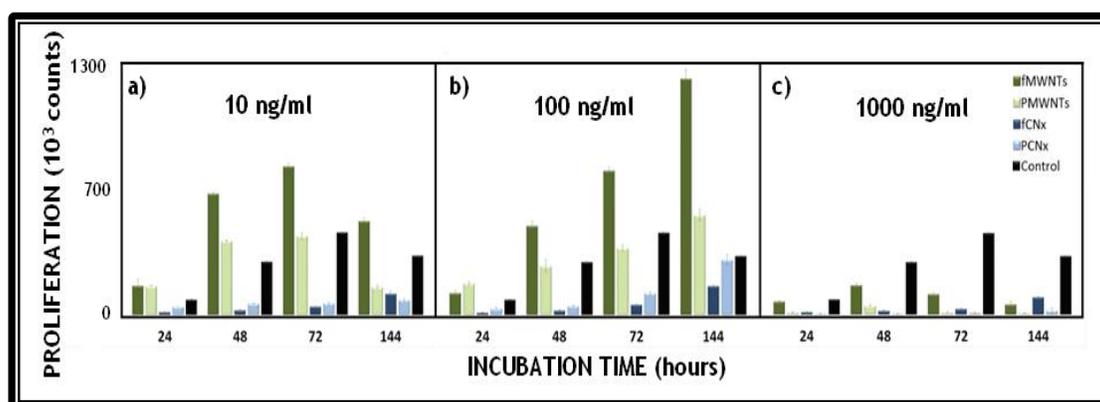


Figura 14. Efectos de proliferación en MSCs en contacto con CNTs. Las barras muestran los efectos de proliferación en MSCs frente al tiempo de incubación a diferentes concentraciones de CNTs. Se registran cuatro tipos de nanotubos de carbono y una muestra control: (a) 10 ng/ml , (b) 100 ng/ml y (c) 1000 ng/ml. El ensayo de azul de tripano se realizó para evaluar la viabilidad celular. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y se expresan como la media de al menos tres experimentos con $p < 0,05$, donde se observa que a 100 ng/ml, los nanotubos de tipo MWNTs favorecen al proceso de proliferación, mientras que los dopados con nitrógeno no lo favorecen.

A partir de los resultados de la apoptosis de la concentración 10 ng/ml (Figura 15a), es evidente desde el principio del experimento que fCNxs causan muerte celular. Por otro lado, el efecto del polímero es clara, con PCNxs se presenta un nivel más bajo de la apoptosis que con fCNxs. La tendencia apoptótica de fCNxs se confirma por el ensayo de proliferación que se muestra en la figura 14a), donde a la misma concentración y tiempo tanto fCNxs y PCNxs no causan proliferación en comparación con la muestra control.

La citotoxicidad de CNxs podría estar relacionado con el alto grado de defectos

confirmados por la relación I_D/I_G reportado en la Tabla 1. De forma correspondiente, a 10 ng/ml, fMWNTs muestran un comportamiento apoptótico en una relación similar a la de control, mientras que PWNTs presentan un menor comportamiento de apoptosis; *i. e.* fMWNTs y PMWNTs presentes capacidad proliferativa superior en contraste con fCNxs y PCNxs (Figura 14a).

El comportamiento apoptótico de fCNxs a 100 ng/ml es el más alto entre los cuatro tipos de soluciones CNTS (Figura 15b), similar al comportamiento en 10 ng/ml. PCNxs a 100 ng/ml, también presenta un comportamiento apoptótica baja con respecto a fCNxs, como con la concentración 10 ng/ml, aun presentando un mayor porcentaje de apoptosis en contraste con el control positivo. Por consiguiente, el comportamiento proliferativo de ambos fCNxs y PCNxs a 100 ng/ml, siempre presenta niveles más bajos que el control. Por lo tanto, es muy importante que para todos CNxs, cuando la inducción de la apoptosis, su capacidad proliferativa disminuye. En contraste, fMWNTs y PMWNTs, a 100 ng/ml, presentar un nivel de apoptosis más alto que el control positivo (siendo inferior a fCNxs y PCNxs).

A pesar de esto, su tendencia proliferativa no disminuye, pero aumenta en todo momento; *i. e.* activan la proliferación de una manera significativa, en particular los fMWNTs. Parece que las MSC, a 100 ng/ml de MWNTs, muestran resistencia a la muerte celular e incluso mejorar su proliferación. Conforme pasa el tiempo para la concentración de 100 ng/ml, aumenta la proliferación en todos los casos y las disminuciones de la apoptosis (Figuras 13 b) y 14b)).

Sorprendentemente, la solución PMWNTs presenta la inducción de apoptosis más baja y una alta capacidad proliferativa en todo momento, incluyendo a las 144 horas. A. A. Kroustalli, *et al.* [18] reportaron resultados similares, mostrando desde el ensayo que PMWNTs apoyan la adhesión y la proliferación de hMSCs. Otros estudios indican que los CNT polimerizadas presentan un menor impacto en la activación de la oxidativo responsable de la vía apoptótica [88], [89], [90].

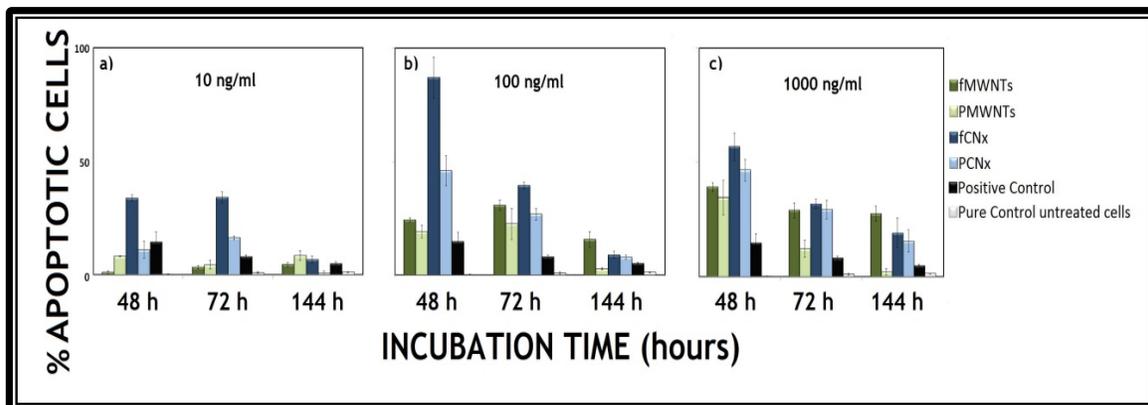


Figura 15. Efectos de apoptosis en MSCs en contacto con CNTs. Se sometieron a prueba fMWNTs , PMWNTs , fCNxs y PCNxs para evaluar apoptosis en las MSCs, comparando cada tipo con un control positivo con peróxido de hidrógeno y con un control puro de células no tratadas en concentraciones de CNTs a 10 ng/ml (a), 100 ng/ml (b) y 1000 ng/ml (c). La apoptosis se evaluó mediante un kit de ensayo de yoduro de Anexina/propidio utilizando una citometría de flujo, la determinación de la muerte celular por activación de Anexina V.

Finalmente, a la mayor concentración de 1000 ng/ml se muestra en las Figuras 13c) y 14c), todas las muestras tenían la más baja capacidad proliferativa compartiendo la misma tendencia apoptótica.

Curiosamente, los resultados más significativos para ambos ensayos de proliferación y apoptosis, están en concentraciones de 100 ng/ml, (que se muestra en las figuras 14b) y 15b)), respectivamente, y resultó estadísticamente significativa por tres experimentos independientes ($p < 0,05$), mostrando alta proliferación y la apoptosis de MWNTs y CNxs respectivamente).

5.2.3.Morfología

El siguiente paso fue analizar por microscopía confocal el comportamiento de MSCs en cultivos realizados con CNTs de cada grupo, centrándose principalmente en la concentración de 100 ng/ml.

La figura 16, muestra la evaluación de la morfología celular y la incorporación intracelular de CNTs en MSCs cultivadas con soluciones de 100 ng/ml . Los núcleos en todos los casos fueron detectados en rojo y los CNTs por auto-

fluorescencia en verde. El control se muestra en la figura 16a (i-iv), la figura muestra por fluorescencia una morfología estándar del núcleo teñido en rojo (Figura 16a (i)). Dado que, no hay CNTs presentes en el control, resulta imposible detectar su fluorescencia a la misma longitud de onda que en el resto de las muestras, aquellas tratadas con CNTs figura 16a (ii). Finalmente campo de luz visible se observa en su totalidad la morfología de las células control o sin tratamiento en el panel (iv) de la figura 16a).

El efecto de las soluciones de 100 ng/ml para todos los CNTs: fMWNTs, PMWNTs, fCNxs y PCNxs se muestra en la figura 16b) y e) respectivamente. Paneles (i) de la figura 16b) y 16d) corresponden a la fluorescencia roja de fMWNTs y fCNxs respectivamente; es interesante observar que muestra un comportamiento aparentemente apoptótico representado por la destrucción del núcleo indicado por círculos blancos. En comparación, los paneles (i) de la figura 16c) y 16e), muestran un núcleo bien ordenado, morfológicamente idéntica a la de control (Figura 16a (i)). Estos paneles (16c (i) y 16e (i)) corresponden a PMWNTs y PCNxs respectivamente, clara evidencia de que el polímero de los PCNTs reduce el comportamiento apoptótico de fCNxs muestra en la Figura 15b).

Paneles (ii) en la figura 16b)-e) muestran la fluorescencia verde de los nanotubos correspondientes dentro de las MSCs. En particular, el caso de fMWNTs y fCNxs en la figura 16b) y 16d), muestran una presencia evidente de los nanotubos en verde, indicado por las flechas blancas.

Paneles (iii) en la figura 16 resultado de la fusión de imágenes correspondientes de los paneles (i) y (ii), que ilustra la posición exacta de los nanotubos con respecto al núcleo. Finalmente paneles de campo claro (iv) se incluyen, en donde la estructura fibrilar de fMWNTs y fCNxs se muestra claramente dentro de las células .

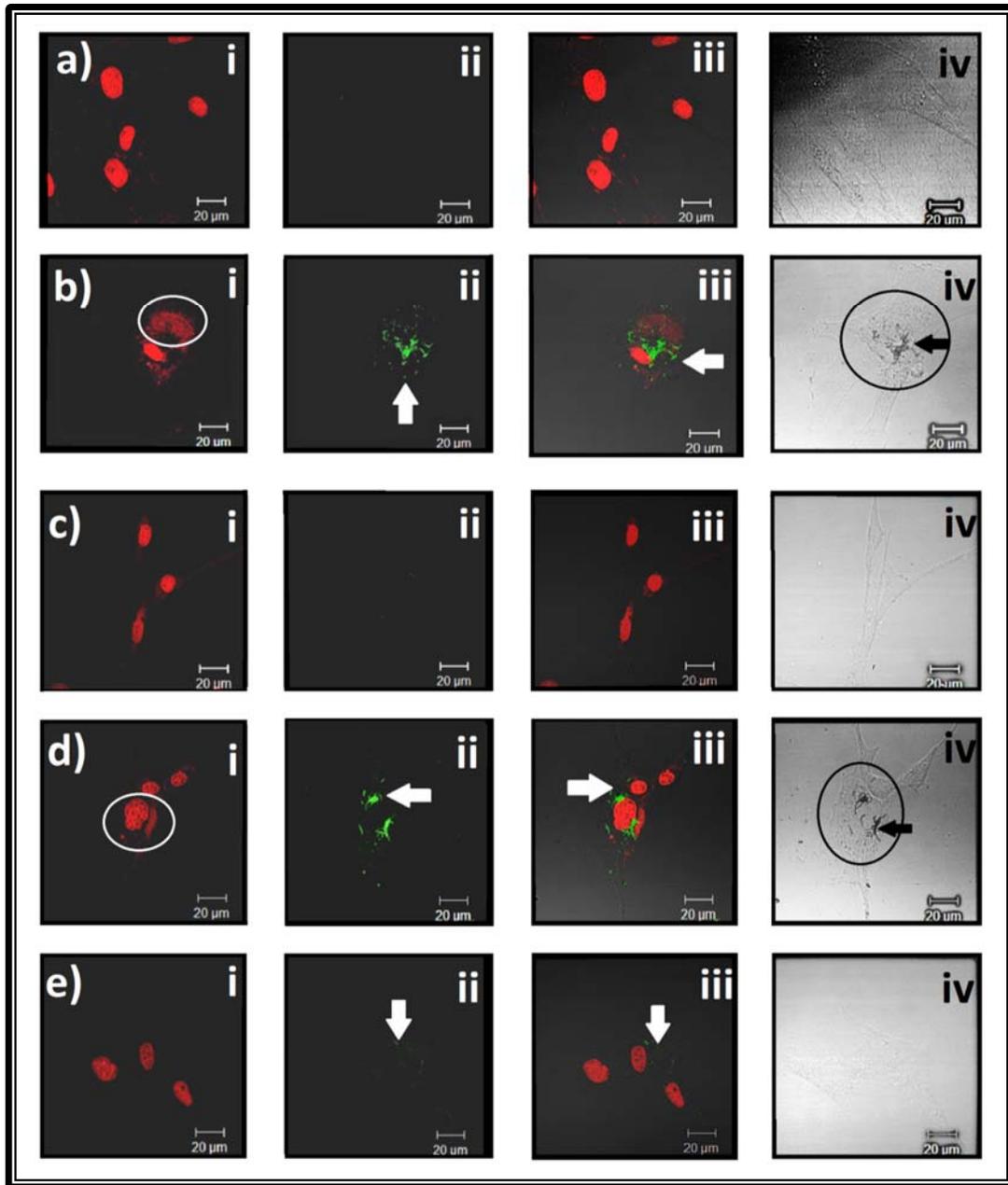


Figura 16. Imágenes de microscopio confocal. Las células MSCs se incubaron durante 72 horas en la solución 100 ng/ml para cada tipo de nanotubo. Muestra control (a) permite observar, en el campo de fluorescencia roja a 488 nm, la morfología de los núcleos sin daño (i), en (ii) el campo de fluorescencia verde a 633 nm para detectar CNTs, con ningún rastro de ellos. Flechas blancas en los paneles muestran la distribución intracelular de fMWNTs (b) , PMWNTs (c) , fCNxs (d) y PCNxs (e). Paneles (i) muestran el campo fluorescencia roja, que ilustra la morfología de los núcleos , los círculos blancos en (bi) y (di) muestran núcleos apoptóticos. Paneles (ii) muestran fluorescencia verde de CNT con clara presencia de nanotubos en las muestras fMWNT y fCNx (b -ii) y (d -ii), respectivamente. Paneles (iii) muestran el partido de (i) y (ii) . Paneles (iv) muestran el campo claro donde fMWNTs y fCNxs presentan la estructura fibrilar de los nanotubos de carbono dentro de las MSCs.

Además de la disminución de la apoptosis en las células tratadas con PMWNTs, interesante fue el hecho de que estos nanotubos en una cantidad importante permanecen fuera de la célula (Figura 17).

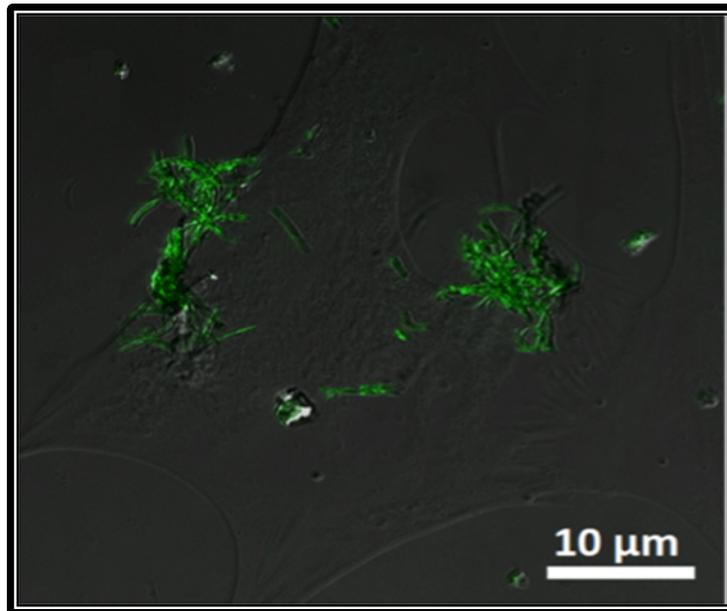


Figura 17. PMWNTs en contacto con MSCs. A diferencia del resto de los CNTs analizadas en cultivos celulares, los PMWNTs están en contacto con las células y se mantienen en su mayoría fuera de ella.

Comparando la facilidad que tienen los nanotubos de ser internalizados en las células [1], se ha demostrado que los MWNTs difieren en sus mecanismos de incorporación intracelular [91]. La capacidad de incorporación de los MWNTs en las células tiene una alta dependencia con el diámetro y longitud; los nanotubos con dimensiones pequeñas presentan mayor capacidad de entrar a la célula. En consecuencia, como se muestra en figuras 15b) y d), fMWNTs y CNxs se localizan dentro, similar a lo reportado por M. Adeli, *et al.*[1]. Por el contrario, PMWNTs y PCNxs se encontraron en poca cantidad dentro de las células, a pesar de tener las dimensiones requeridas para ser incorporados.

El hecho de que PWMNTs y PCNxs no entren a la célula se puede atribuir a la alta presencia de grupos oxigenados, como los presentes en la superficie del PCA

hiper-ramificado, cadenas que interactúan con las proteínas de la matriz extracelular, reduciendo el mecanismo de endocitosis celular [88]. Esta puede ser la razón por la que los CNTs no entran en la célula, a pesar de que los CNT-PCAlated presentan morfología y dimensiones similares a los otros tipos como se muestra en la Tabla 1. Figura 17 refuerza el hecho de que los nanotubos polimerizados entran en menor cantidad a la célula quedándose en la periferia.

También en la figura 16, se muestra cómo el efecto en la morfología de las MSCs, en contacto con PMWNT y PCNx no presentan mayores cambios, contrarrestando con los resultados en polímeros hiperramificados como el PEG, reportado por W. Murphy, *et al.*[25].

Teniendo en cuenta estos resultados, donde los fCNTs entran en la célula [1], [59],[92],[93] se abre una perspectiva de oportunidades de estudio para la creación de vehículos para transportar fármacos [93], [94], [95], terapias contra el cáncer [1], así como para continuar los estudios de disminución citotóxica [94]. La fluorescencia verde de las imágenes confocales dentro de las células, confirma la absorción de fCNx, fenómeno que puede ser utilizado para la estimulación óptica de CNTs dentro de las células y permitir por ejemplo el diseño de transportadores biológicos multifuncionales de CNTs. Por lo tanto, la capacidad de transporte de CNTs combinado con una funcionalización química adecuada y sus propiedades ópticas intrínsecas, se puede trabajar en nuevos nano-materiales para diferentes terapias biomédicas como la antes mencionadas.

Por otro lado, un tema de gran relevancia en este campo es continuar con el estudio de interacción entre los PCNTs y las MSCs, con el objetivo de diseñar y producir andamios [95], [96], [97], sin embargo, continúan algunas preguntas que se requieren responder antes *e.g.* ¿Puede la interacción entre PMWNTs y las MSCs inducir factores de crecimiento y secretar sustancias de las células [25]?, ¿puede el polímero interactuar con las moléculas que se encuentran en la matriz extracelular como los son las glicoproteínas, [98], [99]?, o simplemente aumentan la capacidad adhesiva del material [18], [100], [101]?

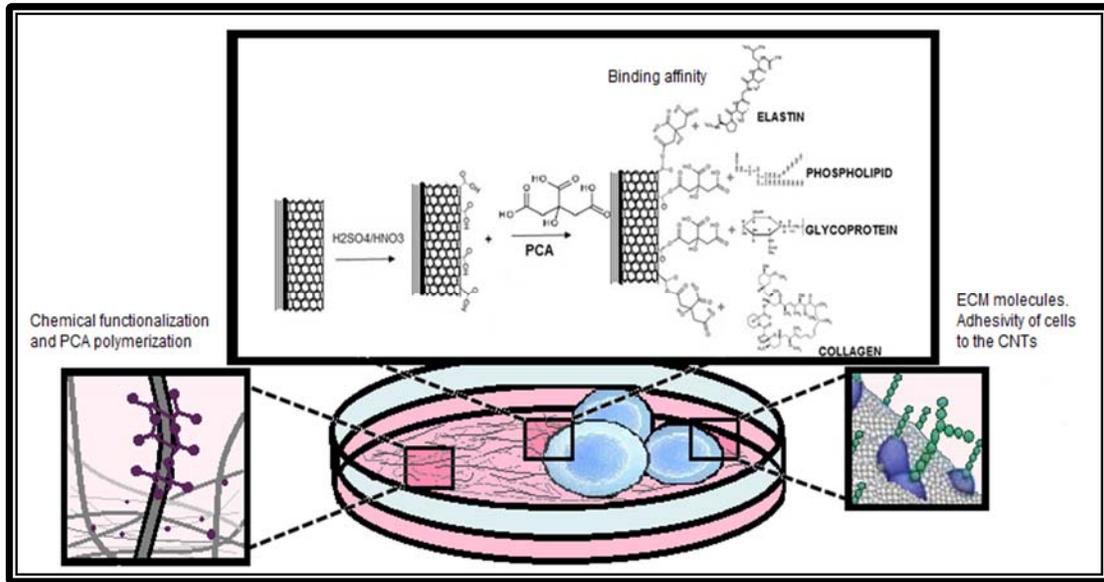


Figura 18. Simulación de interacción PCNT-MSCs. Imagen donde se simula el proceso bioquímico de interacción entre las proteínas de la matriz extra celular y el PCA.

Debido a las características físico-químicas de los nanotubos de carbono recubiertos con PCA, estos proporcionan una clara ventaja para el diseño de los andamios en comparación con los CNTs no modificados: CNTs recubiertos no causan daño intracelular, porque los PMWNTs no pueden ser internalizados dentro de las células. Así que los andamios pueden ser capaces de promover la formación de tejido nuevo, favoreciendo la adhesión celular y la proliferación.

6 CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

La generación y caracterización de los distintos grupos de CNTs utilizados, tanto funcionalizados como polimerizados, permitieron evaluar su capacidad de inducir proliferación, su mecanismo de internalización en la células y su citotoxicidad en el modelo de células madre mesenquimales *in vitro*. Cabe destacar que ésta es la primera vez que los CNT polimerizados con PCA se han utilizado con un modelo celular de MSCs (Figura 16).

Respecto a la caracterización de los nanotubos de carbono multicapa (MWNT) y dopados con Nitrógeno (CNx), se posibilitó conocer el nivel de pureza en la estructura de estos materiales, verificando si la síntesis de ambos acarrea porcentajes considerables de partículas de catalizador, este dato se verificó con el análisis EDS, además se confirmó la cristalinidad y el nivel de impureza en la estructura con el análisis Raman. Con lo anterior y con las muestras obtenidas por TEM y SEM se observó también que los CNx reaccionan mejor al proceso de funcionalización y polimerización. Por otro lado se pudo probar con el análisis infra-rojo (IR) que tanto la funcionalización como la polimerización se llevaron a cabo de manera adecuada (figura 11).

En el análisis de las respuestas de las MSCs en contacto con las diferentes muestras y concentraciones de CNTs, se obtuvieron datos muy reveladores.

Por un lado, los resultados mostraron que el comportamiento de apoptosis y de proliferación es correlativo, comprobado de manera más patente en las células tratadas con fCNxs y PCNxs (Figura 14), que presentan al mismo tiempo las tasas de proliferación más bajas y los niveles de apoptosis más altos (Figura 15). Esto demuestra que son menos viables para aplicaciones de andamiaje celular, pero adecuados para el transporte de sustancias dentro de la célula, incluso para posibles tratamientos contra enfermedades como el cáncer.

En contraste, los MWNTs, tanto funcionalizados como polimerizados, presentan mejores resultados para posibles aplicaciones biomédicas en andamios, ya que, en 100 ng/ml, ambos presentan altas tasas de proliferación y un comportamiento apoptótico menor.

Por otro lado, la morfología [102], [103], de las MSC en contacto con PMWNTs y PCNxs no presenta grandes cambios, a diferencia del cambio causado por los fCNTs (Figura 16). En otras investigaciones se ha observado que los efectos de CNTs polimerizados han causado daño en la morfología celular [18], sin embargo parece que el PCA da buenos resultados al respecto.

Esta investigación contribuye a una mejor comprensión del comportamiento de las MSCs en presencia de CNTs, lo que sugiere alternativas nuevas y campos de investigación futura en el diseño de sistemas de andamiaje. La construcción de una estructura basada en PCA-CNT, donde los nanotubos están bien fijados a la matriz, podría resultar un andamio estable para las células MSC, como se sugiere en la figura 18.

Los resultados aquí reportados invitan utilizar películas basadas en nanotubos unidos por una red bi o tri-dimensional de PCA, para evitar nanotubos individuales que serían desalojados y entrarían en la célula. De esta manera, al parecerse el tejido de la matriz extracelular [95], [96], [97], proporcionan un soporte estructural adecuado y favorecen un buen desarrollo en el área biomédica.

Por último, con el fin de continuar con el estudio de los materiales de carbono con la presencia de MSC, y según las conclusiones obtenidas en el presente trabajo, se considera prometedor el análisis de PCA en estructuras de grafeno polimerizado como biomaterial [101], con la expectativa de que las propiedades de grafeno proporcionen diferentes e interesantes respuestas celulares.

7 REFERENCIAS

- [1] Adeli, M., Soleyman R., Beiranvand, Z., Madani, F. Carbon nanotubes in cancer therapy: a more precise look at the role of carbon nanotube-polymer interactions. *Chem Soc Rev.* 42, 5231-56 (2013).
- [2] Mooney, E., Mackle, J., O’Cearbhail, E., Shawa, G., Blau W., Barry, F., Murphy, M. The electrical stimulation of carbon nanotubes to provide a cardiomimetic cueto MSCs, *Biomaterials*, 36, 6132-9 (2012).
- [3] Adeli, M., Hirbod, S., Soleyman, R. Advances in the biomedical application of polymer-functionalized carbon naotubes. *Biomater. Sci.*, 3, 695-711 (2015).
- [4] Harrison, B., Atala, A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials.* 28, 2344-353 (2007).
- [5] Aguilar, B. Mesenquimales Estromales de Tejido Adiposo de Alta Capacidad Proliferativa: Caracterización y Aplicación a Terapia Celular. EAB TESIS (2012).
- [6] Varghese, S., Hwang, N., Canver, A., Theprungsirikul, P., Lin, D., Elisseeff, J. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.* 27, 12-21 (2012).
- [7] Palenzuela, A. Semblanzas de los premios nobel en Fisiología y Medicina: Células maduras pueden ser programadas hacia células madre pluripotenciales. *Vida Científica.* ISSN: 1989 - 7189 (2012).
- [8] Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, YH., Aryee, MJ., Lensch, MW., Li, H., Collins, JJ. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. Erratum in *Nat Biotechnol.* 1, 112 (2012).
- [9] Vizzaerdi E, Lorusso R, De Cicco G, Zanini G. Daloia A, Dei Cas L. Stem cells and repair of the heart: cell- releasing epicardial scaffolds. *J Cardiovasc Surg.* 53, 685-690, (2012).
- [10] Zhang, L., Chan, C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J Vis Exp* 37, 1852 (2010).
- [11] Ferreira L.S., Gerech S, Fuller J., Shieh H.F., Vunjak - Novakovic G., Langer, R., Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28, 2706 (2007).
- [12] Miyagawa, S., et al. Tissue Cardiomyoplasty Using Bioengineered Contractile Cardiomyocyte Sheets to Repair Damaged Myocardium: Their Integration with Recipient Myocardium. *Transplantation* 11, 1580 -1589 (2005).
- [13] Dresselhaus, M., Dresselhaus, G., Avouris, P. Carbon nanotubes, synthesis, structure, and applications. *Nanotechnology* 80, 391 (2001).
- [14] Terrones, M., Souza-Filho, A.G., Rao, A.M. Doped Carbon Nanotubes: Synthesis, Characterization and Applications. *Topics in Applied Physics* 111, 531-566 (2008).

- [15] Heister, E., Brunner, E., Dieckmann, G., Jurewicz, I., Dalton A. Are Carbon Nanotubes a Natural Solution? Applications in Biology and Medicine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 1870-1891 (2013).
- [16] Mooney, E., Dockery, P., Greiser, U., Murphy, M., Barron, V. Carbon Nanotubes and Mesenchymal Stem Cells: Biocompatibility, Proliferation and Differentiation. *Nano Lett.* 8, 2137-2143. (2008).
- [17] Yi, C., Liu, D., Fong, C. C., Zhang, J., Yang, M. Gold Nanoparticles Promote Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through p38 MAPK Pathway. *ACS Nano* 4, 6439-6448 (2010).
- [18] Kroustalli, A., Kourkouli, S., Deligianni, D. Cellular Function and Adhesion Mechanisms of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Multi-walled Carbon Nanotubes. *Ann Biomed Eng* 41, 2655-65 (2013).
- [19] Correa-Duarte, M., Wagner, N., Rojas-Chapana, J., Morsczech, C., Thie, M., Giersig, M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Letters* 4, 2233-2236 (2004).
- [20] Nayak, T. R., Jian, L., Phua, L. C., Ho, H. K., Ren, Y. P., Pastorin, G. Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation *ACS Nano* 4, 7717-7725 (2010).
- [21] Boehm, H.P. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. *Carbon* 40, 145-9 (2002).
- [22] Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Sánchez, E., Grilo, A., Cameán, A., Jos, A., Influence of carboxylic acid functionalization on the cytotoxic effects induced by single wall carbon nanotubes on human endothelial cells. *Toxicol In Vitro* 25, 1883-8 (2011).
- [23] Isobe, H., et al. Preparation, Purification, Characterization, and Cytotoxicity Assessment of Water-Soluble, Transition-Metal-Free Carbon Nanotube. *Angew Chem Int Ed Engl.* 45, 6676-80 (2006).
- [24] Adeli, M., Mirab, N., Alavidjeh, M., Sobhani, Z., Atyabi, F. Carbon nanotubes-graft-polyglycerol: Biocompatible hybrid materials for nanomedicine. *Polymer* 50, 3528-3536 (2009).
- [25] Murphy, W., McDevitt, T., Engler, A.J. Materials as stem cell regulators. *Nature Materials* 13, 547-557 (2014).
- [26] Gustafsson, Y., et al. Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds. *Biomaterials* 33, 8094-8103 (2012).
- [27] Botello, A., et al. Controlling the dimensions, reactivity and crystallinity of multiwalled carbon nanotubes using low ethanol concentrations. *Chem. Phys. Lett.* 453, 55-61 (2008).
- [28] Sarlak, N., Adeli, M., Karimi, M., Bordbare, M., Farahmandnejad, M. Quantitative study on the interaction of Ag⁺ and Pd²⁺ with CNT-graft-PCA (polycitric acid) in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids* 180, 39 (2013).
- [29] Bahari, A., Hekmatara, H., Sepahvand, R., Adeli, M. Carbon nanotube-graft-poly (Citric acid) containing silver and palladium nanoparticles, *Nano* 4, 217 (2009).
- [30] Adeli, M., Bahari, A., Hekmatara, H., Carbon nanotube Graft-poly (citric acid) Nanocomposites, *Nano* 3, 1 (2008).

- [31] Zhao, B., Hu, H., Yu, A., Perea, D., Haddon, R. Synthesis and Characterization of Water Soluble Single-Walled Carbon Nanotube Graft Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8197-8203 (2005).
- [32] Kainthan, R., Hester, S., Levin, E., Devina, D., Brooks, D. In vitro biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols, *Biomaterials* 28, 4581-4590 (2007).
- [33] Sohmani, Z., Adeli, M., Dinarvand, R., Ghahremani, M., Atyabi, F. Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube. *Nanomed.* 6, 705-719 (2011).
- [34] Lee, J., Abdeen, A., Zhang, D., Kilian, K. Directing stem cell fate on hydrogel substrates by controlling cell geometry, matrix mechanics and adhesion ligand composition. *Biomaterials.* 34, 8140-8148 (2013).
- [35] Hodgkinson, C., Gómez, J., Mirotsoy, M., Dzau, V. Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells and Its Application in Human Disease Therapy. *Human Gene Therapy* 21, 1513-1526 (2010).
- [36] Dalby, M. J., et al. The Control of Human Mesenchymal Cell Differentiation Using Nanoscale Symmetry and Disorder. *Nature Materials* 6, 997-1003 (2007).
- [37] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677-689 (2006).
- [38] Bot, P. T., Hofer, I., Piek, J., Pasterkamp, G. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Curr. Med. Chem.* 15, 786-791 (2008).
- [39] Tsimbouri, P., et al. Nanotopographical effects on mesenchymal stem cell morphology and phenotype. *J. Cell. Biochem* 115, 380-390 (2014).
- [40] Khetan, S., et al. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nature Materials* 12, 458-465 (2013).
- [41] Gouzhong, C., Ying, W., Nanostructures and Nanomaterials, Synthesis, Properties and Applications, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (44), 14679-14679. (2004). 2nd Edition, USA, (2011).
- [42] Bedrov D, Smith GD, Davande H, Li L. Passive transport of C60 fullerenes through a lipid membrane: a molecular dynamics simulation study. *J Phys Chem B.* 112, 2078-2084 (2008).
- [43] Kuilaa, T., Bosea, S., Mishra, AK., Khanraa, P., Kimc, NH., Lee, JH. Chemical functionalization of graphene and its applications. *Progress in Materials Science* 57, 1061- 1105 (2012).
- [44] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56 , 1991.
- [45] Baker, Davis, W.R., Slawson, R.J., Rigby, G.R. An unusual form of Carbon. *Nature.* 171, 756 (1953).
- [46] Baker. Barber, M. A., Harris, P. S., Feates, F. S.; Waite, R. J. Nucleation and Growth Of Carbon Deposits from the Nickel Catalyzed Decomposition of Acetylene. *J. Catal.* 26, 51-62 (1972).

- [47] Ado Jorio, Mildred S. Dresselhaus; Carbon Nanotubes “Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications”. ISSN 17 - 23 (2008).
- [48] Atienzar, Pedro. Síntesis, Propiedades Fotofísicas y Aplicaciones de Nanotubos de Carbono de Pared Única Funcionalizados. Tesis. 17-78 (2007).
- [49] Kis, A., Zettl, A. Nanomechanics of carbon nanotubes. *Phil. Trans. R. Soc.* 10, 1098 (2008).
- [50] Chernozatonskii, A., et al. Bucky-corn: van der Waals composite of carbon nanotube coated by fullerenes. *Molecular Physics.* 4, 46-52 (2015).
- [51] González, R., Martín. Funcionalización de nanomateriales de carbono: Propiedades optoelectrónicas de nanotubos de carbono y aplicaciones de nanopartículas de diamante en catálisis y biocatálisis, Tesis. 24 - 35 (2011).
- [52] Pérez, U., Willfrand, Fabricación y Caracterización de Nanotubos de Carbono Multicapa producidos por PAPVD. Tesis. III (2006).
- [53] R. Martel, T. Schmidt, H. R. Shea, T. Hertel, and Ph. Avouris. Single- and multi-wall carbon nanotube field-effect transistors. *Applied Physics Letter* 73 (1998).
- [54] Cassell, AM., Raymakers, JA., Kong, J., Dai, HJ. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *J Phys Chem B*, 103, 6484-6492 (1999).
- [55] Vossen, J.L., Kern, W. Thin film process II, Academic Press, San Diego, CA, 1991.
- [56] Hofmann, S., Csanyi, G., Ferrari, A. C., Payne, M. C., Robertson, J. Surface Diffusion: The Low Activation Energy Path for Nanotube Growth. *PRL.* 95, 036101 (2005).
- [57] Wagner, R. S., Ellis, W.C. The vapor-Liquid-Solid Mechanism of Crystal Growth and Its Application to Silicon. *Trans.Metall.Soc.Aime.* 233, 1054-1065 (1965).
- [58] García Gaytán, M. A. Decoración de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN_x) con hierro, cobalto y níquel. 105 -134 (2002).
- [59] Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K., Dai, H. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery. *Nano Research* 2, 85-120 (2009).
- [60] Strong KL, Anderson DP, Lafdi K, Kuhn JN. Purification process for single-wall carbon nanotubes. *Carbon* 41(8), 1477-88 (2003).
- [61] Chattopadhyay, D., Galeska, I., Papadimitrakopoulos, F. Complete elimination of metal catalysts from single wall carbon nanotubes. *Carbon* 40, 985-8 (2002).
- [62] Andrews, R., Jacques, D., Qian, D., Dickey, EC. Purification and structural annealing of multiwalled carbon nanotubes at graphitization temperatures. *Carbon* 39, 1681-7 (2001).
- [63] Dillon AC, Gennett T, Jones KM, Alleman JL, Parilla PA, Heben MJ. A simple and complete purification of single walled carbon nanotube materials. *Adv Mater*, 11, 1354-8 (1999).
- [64] Ivan U. Vakarelski, Scott C. Brown,† Ko Higashitani, and Brij M. Moudgil, Penetration of Living Cell Membranes with Fortified Carbon Nanotube Tips. *Langmuir*, , 23 (22), 10893-10896 (2007).

- [65] Martinelli, M., Artinelli, Pablo., Froimowicz, P., Calderón, M., Strumia, M. Materiales Poliméricos Funcionalizados. Parte I: Síntesis y Polimerización de monómeros funcionalizados. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4, (2003).
- [66] Menard-Moyon, C., Kostarelos, K., Prato, M., Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes for Probing and Modulating Molecular Functions. *Chemistry and Biology*, 17, 107-115, (2010).
- [67] Li, W. Z.; Wen, J. G.; Tu, Y.; Ren, Z. F. Effect of gas pressure on the growth and structure of carbon nanotubes by chemical vapor deposition. *Appl. Phys. A*, 73, 259, (2001).
- [68] Zhong, W. Timing cell-fate determination during asymmetric cell divisions. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 472-478 (2008).
- [69] Knoblich, JA., Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597 (2008).
- [70] Blau, HM., Brazelton, TR., Weimann, JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-841 (2001).
- [71] McCullen, S., Stevens, D., Roberts, W., Clarke, L., Bernacki, S., Gorga, R., Lobo, E. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 2, 253-263 (2007).
- [72] Chen, X., Kis, A., Zettl, A., Bertozzi, C. R. A cell nanoinjector based on carbon nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8218-8222 (2007).
- [73] Doe, CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development*, 135(9), 1575-1587 (2008).
- [74] Kam, N. W. S., Jessop, T. C., Wender, P. A., Dai, H. J. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6850 (2004)
- [75] Lu, Q.; Moore, J. M.; Huang, G.; Mount, A. S.; Rao, A. M.; Larcom, L. L.; Ke, P. C. RNA Polymer Translocation with Single-Walled Carbon Nanotubes *Nano Lett* 4, 2473 (2004).
- [76] Pantarotto, D., Briand, JP., Prato, M., Bianco, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)* 16-17 (2004).
- [77] Bianco, A.; Hoebeke, J.; Godefroy, S.; Chaloin, O.; Pantarotto, D.; Briand, J.; Muller, S.; Prato, M.; Partidos, C. D. Template assisted layer-by-layer fabrication of protein Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1679-1682 (2005).
- [78] Welsh. *Histología*. Ed. Médica Panamericana, 136 (2008).
- [79] Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 8va edición. 238-279 (2010).
- [80] Andon FT, Fadeel B. Programmed cell death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials. *Acc Chem Res* 46 (3), 733-742 (2013).
- [81] Jiang, Y., et al. Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS One* 10, 1371 (2013).

- [82] Vicente, J.L., et al. Effect of acid oxidation treatment on adsorption properties of arc-discharge synthesized multiwall carbon nanotubes. *The Journal of the Argentine Chemical Society* 98, 29-38 (2011).
- [83] Liu, J., et al. Fullerene Pipes. *Science* 20, 1253-1256 (1998).
- [84] Gong, K., Du, F., Xia, Z., Durstock, M., Dai, L. Nitrogen-Doped Carbon Nanotube Arrays with High Electrocatalytic Activity for Oxygen Reduction. *Science* 323, 760-764 (2009).
- [85] Bower, C., Kleinhammes, A., Wu, Y., Zhou, O. Intercalation and partial exfoliation of single-walled carbon nanotubes by nitric acid. *Chem Phys Lett* 288, 481-6 (1998).
- [86] Datsyuk, V., et al. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* 46, 833-840 (2008).
- [87] Kuhlmann, U., Jantoljak, H., Pfänder, N., Bernier, P., Journet, C., Thomsen, C. Infrared active phonons in single-walled carbon nanotubes. *Chem Phys Lett* 294, 237-40 (1998).
- [88] Zhang, Y., et al. Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells. *ACS Nano* 5, 7020-7033 (2011).
- [89] Wang, X., et al. Dispersal state of multiwalled carbon nanotubes elicits profibrogenic cellular responses that correlate with fibrogenesis biomarkers and fibrosis in the murine lung. *ACS Nano* 5, 9772-9787 (2011).
- [90] Tabet, L., Bussy, C., Setyan, A., Simon-Deckers, A., Rossi, M.J. Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. *Part Fibre Toxicol* 8, 13 (2011).
- [91] Kang, B., Chang, S., Dai, Y., Yu, D. Cell Response to Carbon Nanotubes: Size-Dependent Intracellular Uptake Mechanism and Subcellular Fate. *Small* 6, 2362-2366 (2010).
- [92] Chen, X., Schluesener, H.J. Multi-walled carbon nanotubes affect drug transport across cell membrane in rat astrocytes. *Nanotechnology* 21, 105104 (2010).
- [93] Johnston, H., Hutchison, G., Christensen, F., Peters, S., Hankin, S. A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro Functionalized MWCNTs on Apoptosis of Macrophages. *Nanotoxicology* 4, 207-246 (2013).
- [94] Cheng, C., et al. Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials* 30, 4152-4160 (2009).
- [95] Huebsch, N., et al. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature Materials* 9, 518-526 (2010).
- [96] Trappmann, B., et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature Materials* 11, 642-649 (2012).
- [97] Li, X., et al. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials* 33, 4818-4827 (2012).
- [98] Del Gaudio, C., Baiguera, S., Ajallouei, F., Bianco, A., Macchiarini, P. Are synthetic scaffolds suitable for the development of clinical tissue-engineered tubular organs?. *Biomedical Materials Research*. 102, 2427-47 (2013).

- [99] Liu, L., et al. Novel strategy to engineer trachea cartilage graft with marrow mesenchymal stem cell macroaggregate and hydrolysable scaffolds. *Artif. Organs* 34, 426-433 (2010).
- [100] Kloxin, A., Kasko, A., Salinas, C., Anseth, K. Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science* 324, 59-63 (2009).
- [101] Li, N., et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci. Rep.* 3, 1604 (2013).
- [102] McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., Chen, C. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 6, 483-495 (2004).
- [103] Kilian, K., Bugarija, B., Lahn, B., Mrksich, M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 107, 4872-4877 (2010).
- [104] Lee, JH., Shim, W., Kang, WS., Kim, HS., Choi, J., Kim JH. Random Networks of Single-Walled Carbon Nanotubes Promote Mesenchymal Stem Cell's Proliferation and Differentiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (3), pp 1560-1567 (2015).

8 ANEXOS

8.1 Figuras

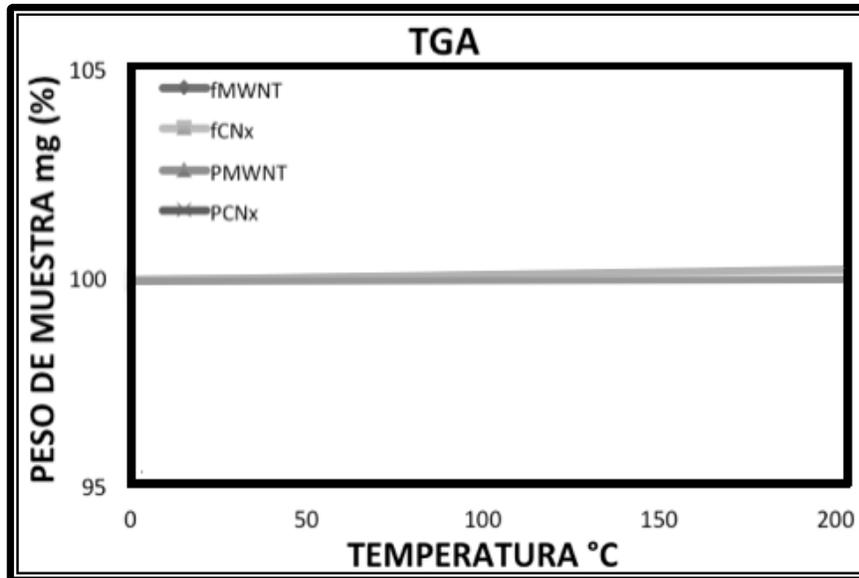


Figura A1. Caracterización termo-gravimétrica (TGA). TGA realizado bajo un flujo de N_2 a 50 ml min^{-1} y un incremento térmico de 15 °C a 200 °C en 90 min con una velocidad de calentamiento de 10 °C min^{-1} . El intervalo de 15 °C a 200 °C muestra sólo un 1% de variación.



Figura A2. Crecimiento de nanotubos de carbono en cuarzo. Los números del 2 al 6 son los que presentan mayor cantidad de nanotubos debido a que se encontraban justo en medio del tubo.

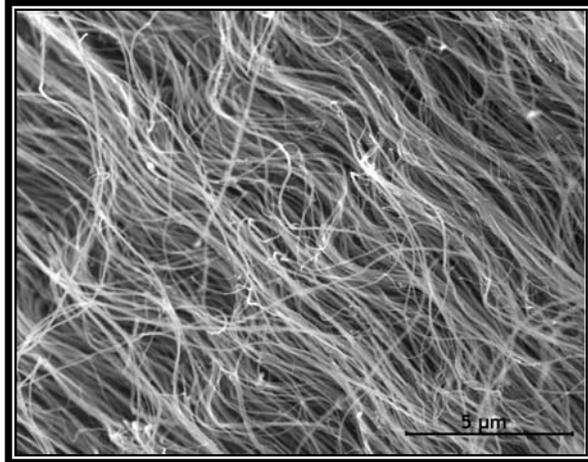


Figura A3. Micrografía SEM a 5 μ de MWNTs antes de someterlos a tratamiento.

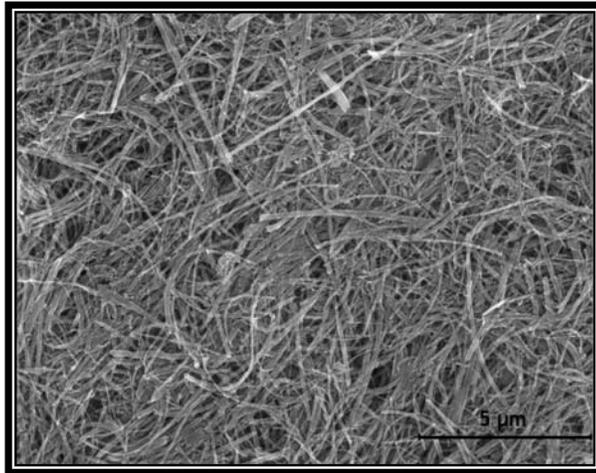


Figura A4. MWNTs después de funcionalizarlos a tratamiento ácido (3:1 H₂SO₄:HNO₃).

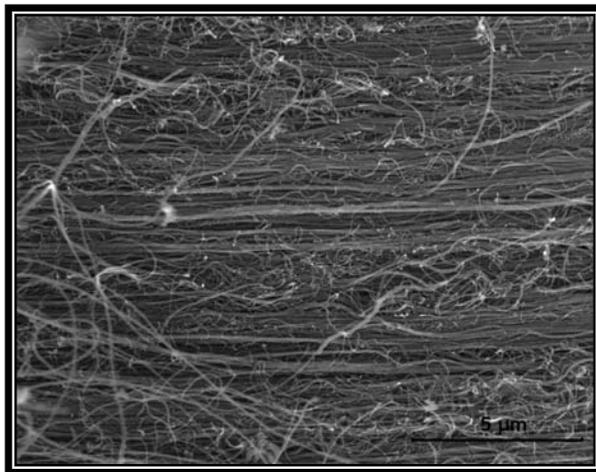


Figura A5. Micrografía SEM a 5 μ de CNx antes de someterlos a tratamiento ácido.

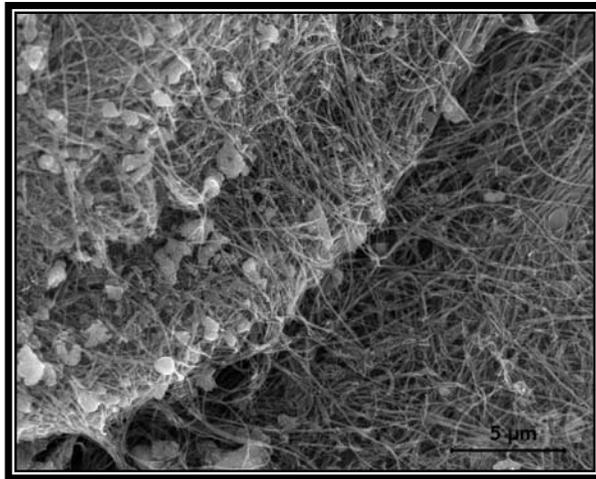


Figura A6. CNxs después de funcionalizarlos a tratamiento ácido (3:1 $H_2SO_4:HNO_3$)

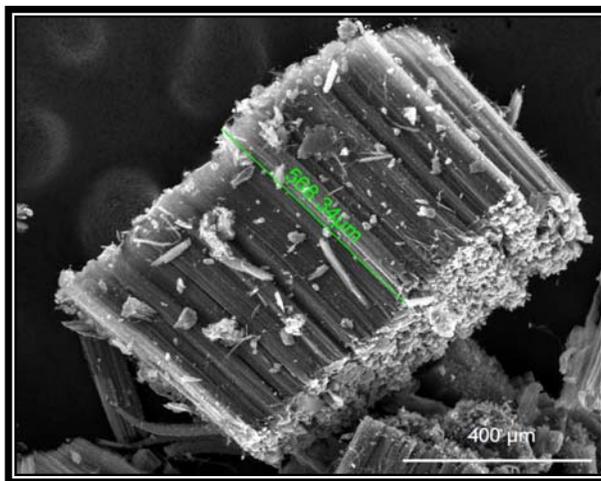


Figura A7. Longitud promedio de MWNTS alcanzada a 15 minutos de CVD.(A. det EDT).

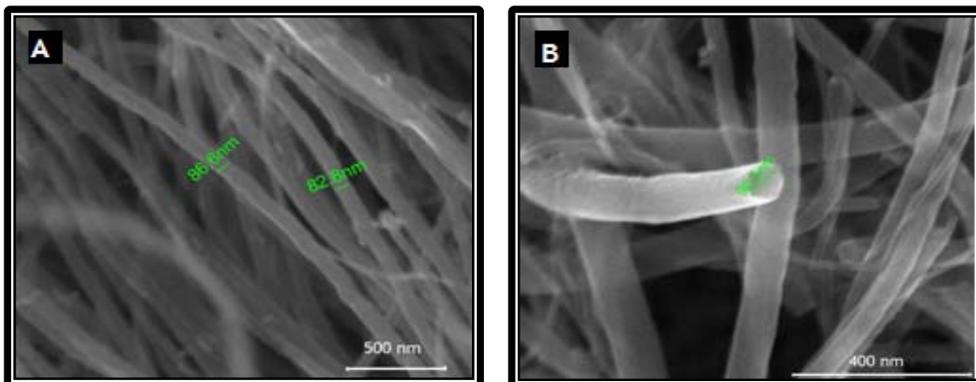


Figura A8. Imágenes SEM de MWNTs que representan las muestra de medición de diámetro. (A) det EDT, B) det. TLD).

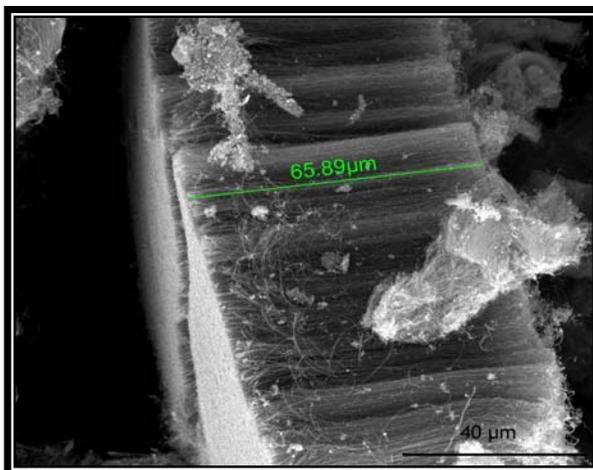


Figura A9. Longitud promedio de CNxs alcanzada a 15 minutos de CVD. (A. det EDT).

8.2 Glosario de Acrónimos y definiciones

1. AB, *Antibiotic.*
2. BSA, *Bovine serum albumin.*
3. CAMs, *Cell Adhesion Molecules.*
4. CNT, *carbon nanotube.*
5. CVD, *chemical vapor deposition.*
6. CNx, *Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno.*
7. DMEM, *Dulbecco`s Modified Eagle Medium.*
8. fCNT, *Nanotubos de Carbono funcionalizados con ácido.*
9. fCNx, *Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno funcionalizados con ácido.*
10. fMWNTs, *Nanotubos de Carbono multicapa funcionalizados con ácido.*
11. hMSC, *human mesenchymal stem cells.*
12. iPS, *Induced Pluripotent Stem.*
13. MSC, *Mesenchymal stem cells.*
14. MWNT, *multi wall carbon nanotubes.*
15. PBS, *Phosphate Buffered Saline.*
16. PCA, *Poly Citric Acid.*
17. PCNT, *Nanotubos de Carbono polimerizados con ácido poli-cítrico.*
18. PCNx, *Nanotubos de Carbono dopados con Nitrógeno polimerizados con ácido poli-cítrico.*
19. PEG, *polietilenglicol.*
20. PEGylated, *capa fina de polietilenglicol.*
21. PET, *Polyethylene terephthalate.*
22. PG, *Poliglicerol.*

23. PMWNT, *Nanotubos de Carbono multicapa polimerizados con ácido policitrico.*
24. PU, *Poliuretano.*
25. SEM, *Scanning Electron Microscopy.*
26. SWNT, *Single Wall Carbon Nanotube.*
27. TEM, *Transmission electron microscopy.*
28. VLS, *Vapor liquid - solid.*
29. VSS, *Vapor solid - solid.*
30. ZAF, *Atomic number, absorption and fluorescence.*