

Exposición de nanotubos de carbono de pared múltiple a espermatozoides humanos

Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotubes to Human Sperm

Yamile Cardona Maya¹ <https://orcid.org/0000-0001-7357-0379>

Cesar A. Isaza Merino² <https://orcid.org/0000-0001-6632-9691>

Walter D. Cardona Maya^{3*} <https://orcid.org/0000-0003-0062-6444>

¹Universidad Católica Luis Amigó, Departamento de Ciencias Básicas. Medellín, Colombia.

²Institución Universitaria Pascual Bravo, Facultad de Ingeniería, Grupo GIEN. Medellín, Colombia.

³Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina, Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología. Medellín, Colombia.

*Autor para la correspondencia: wdario.cardona@udea.edu.co

RESUMEN

Introducción: La nanotecnología se proyecta como un pilar fundamental en las ciencias de la salud debido a sus importantes aplicaciones. Seguramente no será extraño hablar en el futuro cercano de nanosensores o nanorobots que desempeñen labores diagnósticas y terapéuticas. El uso de materiales a escala nanométrica se ha incrementado en los últimos años, en especial los materiales con estructuras a base de carbono como son los nanotubos de carbono, grafeno, grafito y fullerenos.

Objetivo: Determinar el efecto de los nanotubos de pared múltiple sobre los espermatozoides humanos.

Métodos: Para el estudio se incluyeron doce muestras de semen de voluntarios sanos y se siguieron los lineamientos establecidos en el Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud. Las muestras fueron incubadas con la solución de los nanotubos de carbono dispersados a una concentración final de 1 % e durante 120 min. y la movilidad espermática fue cuantificada al tiempo cero, a los 30, 60 y 120 minutos.

Resultados: Se encontró que la movilidad progresiva espermática no se afectó en función del tiempo ($p > 0,05$), sin embargo, desde el tiempo cero de incubación se observa que algunos espermatozoides quedan atrapados al interactuar con los nanotubos de carbono al inhibirse su desplazamiento.

Conclusiones: Los nanotubos de múltiples paredes de carbono no tienen efectos adversos sobre la calidad seminal en humanos, por lo tanto, los dispositivos construidos y los procedimientos que emplean estas moléculas serían seguros para la salud sexual y reproductiva masculina.

Palabras clave: nanotubos de carbono; espermatozoides; salud humana; fertilidad; salud sexual y reproductiva.

ABSTRACT

Introduction: Nanotechnology is projected as a fundamental pillar in the health sciences due to its important applications. Surely it will not be strange to speak in the near future of nanosensors or nanorobots to perform diagnostic and therapeutic tasks. The use of nano-scale materials has increased in recent years, especially with carbon-based structures such as carbon nanotubes, graphene, graphite and fullerenes.

Objective: To determine the effect of multi-walled nanotubes on human sperm.

Methods: Twelve semen samples from healthy volunteers were included for the study and the guidelines established in the World Health Organization Human Semen Processing Manual were followed. The samples were incubated with the solution of the dispersed carbon nanotubes at a final concentration of 1% for 120 min. and sperm motility was quantified at time zero, at 30, 60 and 120 minutes.

Results: It was found that progressive sperm motility was not affected as a function of time ($p > 0.05$), however, from time zero of incubation, it is observed that some sperm are trapped by interacting with carbon nanotubes by inhibiting their displacement.

Conclusions: Multi-walled carbon nanotubes do not have adverse effects on seminal quality in humans, therefore, the devices constructed and the procedures that employ these molecules would be safe for the male sexual and reproductive health.

Keywords: carbon nanotubes; sperm; human health; fertility; sexual and reproductive health.

Recibido: 16/01/2020

Aceptado: 01/02/2020

Introducción

Debido a los avances en nanotecnología, han surgido grandes desarrollos en la medicina.^(1,2,3) Una de las aplicaciones más importantes es el uso de nanopartículas como vehículos transportadores para la liberación controlada de fármacos que mejorara la estabilidad, la solubilidad y la biodistribución.^(1,2) La nanotecnología trata de desarrollar nuevos sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades en los estados más tempranos posibles. Las propiedades físicas que tienen nanoestructuras como el polietilenglicol, grafenos o nanotubos de carbono (CNT)^(1,4,5) los convierten en excelentes candidatos para el desarrollo de sistemas que permitan una detección específica y discriminada de sustancias químicas y/o biológicas, con alta sensibilidad y en tiempos más cortos que los métodos convencionales.^(2,3,6) Sin embargo, aún existen pocos conocimientos sobre la capacidad de escalar la producción de estos nanomateriales a los niveles necesarios para su aplicación, reproducibilidad, aspectos regulatorios, y posibles efectos adversos.

Los CNT son de gran importancia en la nanotecnología, constituyen en gran medida uno de los nanomateriales más estudiados en la actualidad debido a sus extraordinarias propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas que los han llevado a encontrar diversas aplicaciones en electrónica, ciencia de materiales, sensores, biotecnología, química, energía, mecánica, instrumentación científica y fotónica.⁽⁷⁾ En medicina, los CNT han sido estudiados como biosensores,⁽⁸⁾ sistemas de liberación controlada de fármacos,⁽¹⁾ agentes con propiedades antibacterianos,⁽⁹⁾ en el mejoramiento de las prótesis y los implantes^(10,11) e incluso en Urología.^(6,12,13,14)

Aunque los nanotubos de carbono presentan generalmente baja toxicidad, existe evidencia en modelos murinos en los cuales la exposición a nanotubos indujo alteraciones en los pulmones e incluso en la formación de un ateroma,^(15,16) lo cual podría estar regulado por un aumento en el estrés oxidativo que regule negativamente la funcionalidad espermática.

Los nanotubos de carbono se pueden dividir en dos grupos: los nanotubos de carbono de pared simple (*SWCNT – Single Wall Carbon Nanotubes*), que están constituidos por átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal cilíndrica; y los nanotubos de carbono de pared múltiple (*MWCNT – Multiwall Carbon Nanotubes*) los cuales presentan una estructura similar a varios SWCNT concéntricos con diferentes diámetros. En ambos casos, la característica principal es su relación longitud/diámetro muy elevada, su diámetro es del orden de los nanómetros y su longitud puede variar desde unas micras hasta milímetros, e incluso algunos centímetros.⁽¹⁷⁾ Es importante destacar, que los nanotubos de carbono poseen una composición química y configuración atómica sencilla, sin embargo, dentro los nanomateriales conocidos se exhibe, posiblemente, la más vasta diversidad y riqueza en relación con sus estructuras y propiedades intrínsecas.⁽¹⁷⁾

En un estudio previo de *Waseem Asghar* y otros,⁽¹⁸⁾ publicado en 2016, se demostró que los nanotubos de pared simple no tienen efecto negativo sobre los espermatozoides humanos. Sin embargo, no se conoce el efecto de los nanotubos de pared múltiple sobre los gametos masculinos, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los nanotubos de pared múltiple sobre los espermatozoides humanos.

Métodos

Dispersión de los nanotubos

Debido a la capacidad para formar aglomerados de los nanotubos y la dificultad de realizar y mantener la dispersión, los estudios de exposición y toxicidad pueden llegar a ser muy poco acertados debido a que la exposición no se realiza de manera efectiva porque el área expuesta es mucho menor cuando los nanotubos están aglomerados. Por este motivo, lograr una buena dispersión es fundamental antes de realizar la exposición de los nanotubos a los espermatozoides.

El procedimiento de dispersión se basó en el protocolo descrito previamente.⁽¹⁹⁾ Brevemente, a una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 2 %, a una temperatura de 40 a 50 °C en constante agitación, se le agregaron los CNT (2 %) durante 5 minutos aproximadamente (Fig. 1A). Posteriormente la solución de PVA + CNT se somete a agitación ultrasónica (VCX 750 Sonicator) por un período de 1 a 2 horas de exposición con frecuencias de 25 kHz hasta 35 kHz, y con potencias de 100W con el propósito de no generar daños del CNT (FFig. 1B).⁽¹⁹⁾

Ensayo *in vitro*

Se incluyeron doce muestras de semen de voluntarios aparentemente sanos, obtenidas mediante masturbación en un recipiente estéril, después de dos a cinco días de abstinencia sexual y analizadas máximo una hora después de su recolección. Se siguieron los lineamientos establecidos en el Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud en 2010.⁽²⁰⁾ Los voluntarios tenían un promedio de edad de $24,6 \pm 5,7$ años.

Las muestras de semen fueron incubadas con la solución de los nanotubos a una concentración final de 1 % durante 120 minutos (Fig. 1C). Se cuantificó la movilidad espermática al tiempo cero, a los 30, 60 y 120 minutos (FFig. 1D).

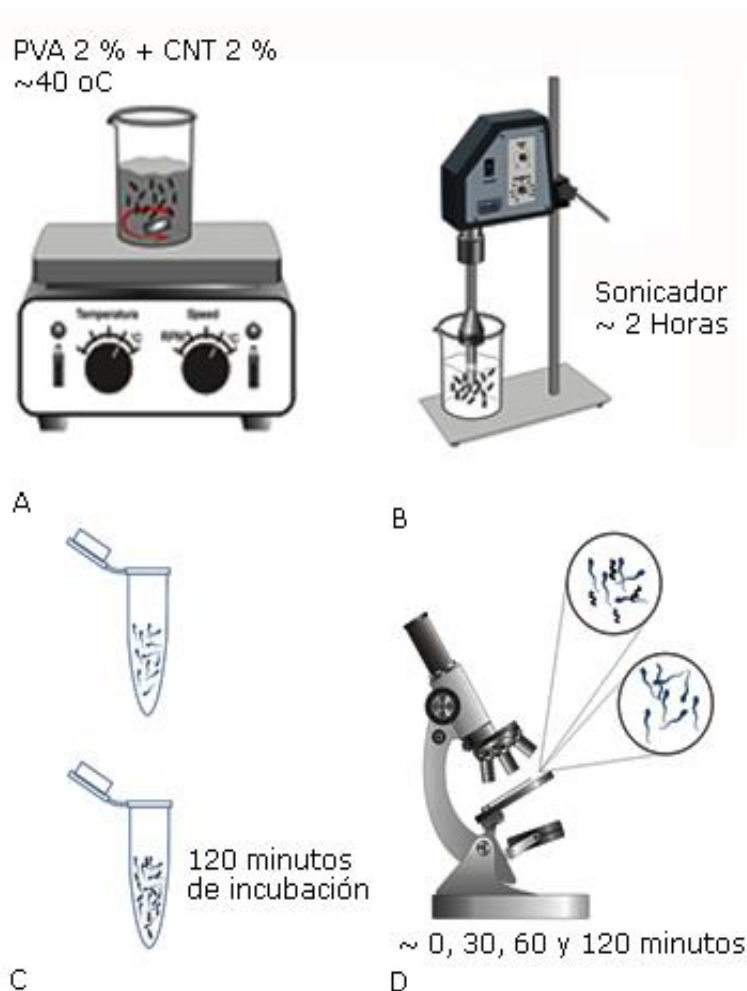


Fig. 1. Esquema del procedimiento. A) agitación magnética; B) ultrasonido; C) incubación; D) observación y cuantificación de k efecto del nanotubo sobre la movilidad espermática.

Resultados

Durante los ensayos *in vitro* se evidenció que la movilidad progresiva espermática no se afecta en función del tiempo $p > 0,05$, cuando se incuban con los nanotubos de carbono a una concentración final de 1 % (Fig. 2).

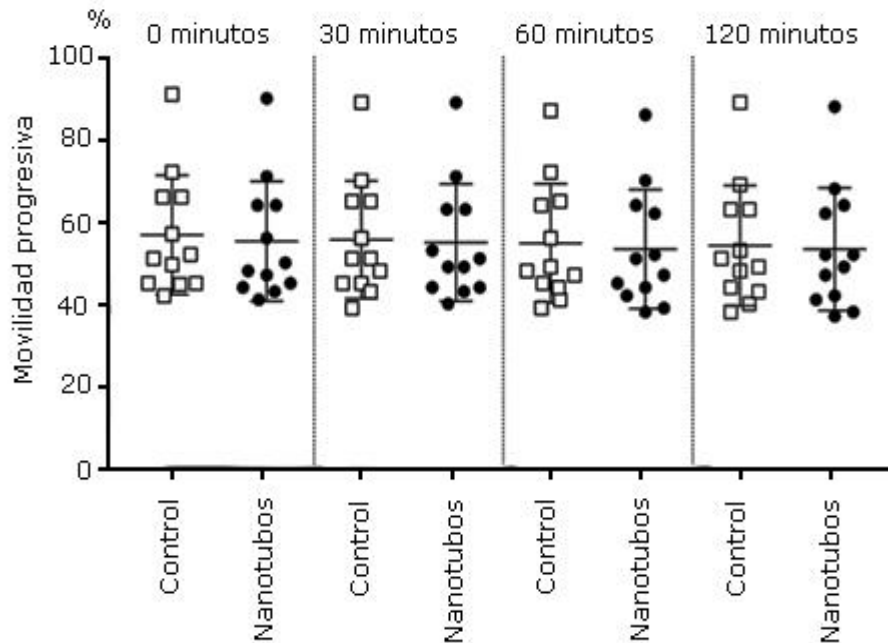


Fig. 2 - Cuantificación de la movilidad en función del tiempo, espermatozoides incubados en ausencia (cuadros blancos) o presencia de nanotubos de carbono (círculos negros).

Sin embargo, desde el tiempo cero se observa que algunos espermatozoides quedan atrapados al interactuar con los nanotubos de carbono, lo cual inhibe su desplazamiento, e incluso comienzan a formar agregados (Fig. 3).

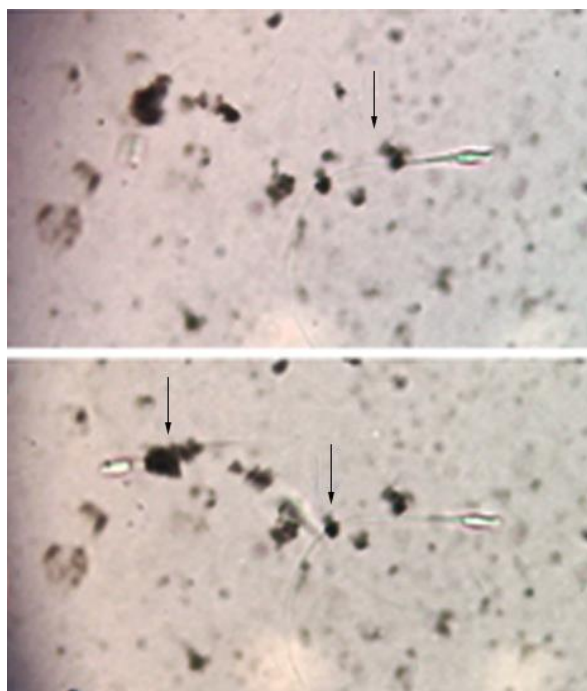


Fig. 3 - Interacción entre nanotubos y espermatozoides (flechas).

Es importante anotar que al seguir el protocolo previamente descrito se garantiza que los nanotubos de carbono están bien dispersos y se encuentran en toda la solución en la que se encuentran los espermatozoides.⁽¹⁹⁾ Sin embargo, la resolución del microscopio no alcanza el tamaño de los nanotubos individuales, que son considerablemente más pequeños que los espermatozoides.

Discusión

Basados en los resultados y en la literatura, esta es la primera aproximación que demuestra *in vitro*, que los nanotubos de carbono de pared múltiple no tienen efecto sobre la calidad seminal, aunque algunos espermatozoides interactúan con los nanotubos de forma directa e independiente del tiempo de incubación.

La correcta dispersión de los nanotubos de carbono fue cuidadosamente realizada, se logra así la mayor exposición posible a los espermatozoides para la obtención confiable de los resultados. Los nanotubos se aglomeran fácilmente, y tener una buena dispersión es clave durante su uso en los ensayos biológicos que pretendan determinar el efecto de los nanotubos, moléculas en creciente desarrollo y uso en la salud humana.

Resultados contradictorios respecto al efecto de los nanotubos se han observado en diferentes modelos celulares, mientras en macrófagos peritoneales de ratón⁽²¹⁾ y en las líneas celulares *Hela* y *Jurkat*⁽²²⁾ no se observan efectos negativos en neumocitos humanos,⁽²³⁾ ni células epiteliales de pulmón.⁽²⁴⁾

Tanto *Bai* y otros,⁽²⁵⁾ *in vivo*, en un modelo de ratones, como *Asghar* y otros,⁽¹⁸⁾ *in vitro*, en humanos, demostraron que los nanotubos no afectan ni la viabilidad ni la movilidad espermática. La movilidad espermática es uno de los parámetros reproductivos más importantes durante la evaluación de la calidad seminal, cualquier molécula o estímulo que afecte negativamente la movilidad podría repercutir negativamente sobre el potencial fértil masculino y finalmente repercutirá negativamente sobre la conservación de la especie debido a que se afecta la posibilidad de esos espermatozoides de interactuar con el oocito. Sin embargo, como se observó en el estudio de *Asghar* y otros,⁽¹⁸⁾ con el uso de nanotubos de pared simple en el presente estudio, tampoco se afectó la movilidad progresiva de los espermatozoides, incluso después de dos horas de incubación.

En conclusión, en el presente estudio no se observaron afectaciones en la movilidad espermática *in vitro* durante la exposición de los espermatozoides a los nanotubos de carbono de pared múltiple. Esto indica que los posibles dispositivos construidos, así como los procedimientos con estas moléculas serían seguros para la salud sexual y reproductiva masculina. Más estudios son necesarios para determinar el efecto de los nanotubos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides y el efecto sobre el desarrollo embrionario.

Material suplementario, enlace al video

<https://drive.google.com/file/d/1rYwRzE0EZLIMISSVmPuVfYIwuxpUag3G/view?usp=sharing>

Referencias bibliográficas

1. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(6):674-9.
2. Maiti D, Tong X, Mou X, Yang K. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Front Pharmacol.* 2018;9:1401.
3. Raphey VR, Henna TK, Nivitha KP, Mufeedha P, Sabu C, Pramod K. Advanced biomedical applications of carbon nanotube. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;100:616-30.

4. Goenka S, Sant V, Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2014;173:75-88.
5. Hubbell JA, Chilkoti A. Chemistry. Nanomaterials for drug delivery. *Science*. 2012;337(6092):303-5.
6. Li C, Curreli M, Lin H, Lei B, Ishikawa FN, Datar R, et al. Complementary detection of prostate-specific antigen using In₂O₃ nanowires and carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*. 2005;127(36):12484-5.
7. Ando Y. Carbon nanotube: the inside story. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10(6):3726-38.
8. He Z, Zhou G, Byun JH, Lee SK, Um MK, Park B, et al. Highly stretchable multi-walled carbon nanotube/thermoplastic polyurethane composite fibers for ultrasensitive, wearable strain sensors. *Nanoscale*. 2019.
9. Kassem A, Ayoub GM, Malaeb L. Antibacterial activity of chitosan nano-composites and carbon nanotubes: A review. *Sci Total Environ*. 2019;668:566-76.
10. Alizadeh A, Razmjou A, Ghaedi M, Jannesar R. Nanoporous solid-state membranes modified with multi-wall carbon nanotubes with anti-biofouling property. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:1669-85.
11. Popat KC, Eltgroth M, La Tempa TJ, Grimes CA, Desai TA. Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants? *Small*. 2007;3(11):1878-81.
12. Kim JP, Lee BY, Lee J, Hong S, Sim SJ. Enhancement of sensitivity and specificity by surface modification of carbon nanotubes in diagnosis of prostate cancer based on carbon nanotube field effect transistors. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(11):3372-8.
13. Kang BJ, Jeun M, Jang GH, Song SH, Jeong IG, Kim CS, et al. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6555-69.
14. Jayasimha S. Nanotechnology in Urology. *Indian J Urol*. 2017;33(1):13-8.
15. Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young SH, et al. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):377-82.
16. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5):698-708.

17. Karousis N, Suárez-Martínez I, Ewels CP, Tagmatarchis N. Structure, Properties, Functionalization, and Applications of Carbon Nanohorns. *Chem Rev.* 2016;116(8):4850-83.
18. Asghar W, Shafiee H, Velasco V, Sah VR, Guo S, El Assal R, et al. Toxicology Study of Single-walled Carbon Nanotubes and Reduced Graphene Oxide in Human Sperm. *Sci Rep.* 2016;6:302-70.
19. Isaza CA, Herrera Ramírez J, Ledezma Sillas J, Meza J. Dispersion and alignment quantification of carbon nanotubes in a polyvinyl alcohol matrix. *Journal of Composite Materials.* 2018;52(12):1617-26.
20. World Health Organization. World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. p. 287.
21. Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc.* 2004;126(48):15638-9.
22. Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine.* 2010;6(2):245-56.
23. Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology.* 2008;253(1-3):137-46.
24. Zhao X, Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int.* 2012;40:244-55.
25. Bai Y, Zhang Y, Zhang J, Mu Q, Zhang W, Butch ER, et al. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(9):683-9.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Yamile Cardona Maya (desarrollo de la experimentación, análisis de la información, redacción del manuscrito, revisión y aprobación de la versión final).

Cesar A. Isaza Merino (desarrollo de la experimentación, análisis de la información, redacción del manuscrito, revisión y aprobación de la versión final).

Walter D. Cardona Maya (desarrollo de la experimentación, análisis de la información, redacción del manuscrito, revisión y aprobación de la versión final).