

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Nanodispensadores de Fármacos Antitumorales Basados en
Nanotubos de Carbono: Diseño, Evaluación y
Biocompatibilización.**

*Antitumoral Drugs Nanocarriers Based on Carbon Nanotubes: Design,
Evaluation and Biocompatibility*

Tesis doctoral presentada por **Eloísa González Lavado** para optar al grado
de doctor por la Universidad de Cantabria

Dirigida por: **Dra. Mónica López Fanarraga**
Dr. Rafael Valiente Barroso

Santander, Diciembre de 2018

Dña. **Mónica López Fanarraga**, profesora titular del departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y D. **Rafael Valiente Barroso**, profesor titular del departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN: que Dña. **Eloísa González Lavado** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Nanodispensadores de Fármacos Antitumorales Basados en Nanotubos de Carbono: Diseño, Evaluación y Biocompatibilización.”

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 16 de Octubre de 2016.

Fdo. Mónica López Fanarraga
(Directora y Tutora)

Rafael Valiente Barroso
(Codirector)

Agradecimientos

Decía el autor Bernard Shaw que la vida consiste en crearse a uno mismo. Hace cuatro años tomé la decisión de salir de mi querida Extremadura para emprender un viaje científico que me ayudaría a crecer como profesional, y que, aunque en ese momento no lo imaginaba, me transformaría como persona.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para agradecer a todas aquellas personas que han estado a mi lado durante el intenso viaje que supone la realización de una tesis doctoral. En primer lugar me toca mencionar a mis directores de tesis, los doctores Mónica López Fanarraga y Rafael Valiente Barroso por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha sido todo un privilegio contar con vuestra guía y ayuda.

Gracias a Jesús González por su enseñanza y su aporte en esta tesis en el ámbito de la espectroscopía Raman, a Carmen Pesquera y Fernando González por su contribución a la parte química de este trabajo, a Fidel Fernández por su disponibilidad y ayuda, a Juan Villegas por su evaluación continuada de esta tesis, y en general a todo el grupo de Nanomedicina de la Universidad de Cantabria, con vosotros aprendí de verdad lo que es un equipo. Agradecer también la acogida y enseñanza recibida por parte del equipo Team Nano Tech de la Universidad de Vigo durante mi estancia en Galicia, en especial a los doctores Miguel Ángel Correa Duarte y Ana Sousa Castillo.

He de destacar de forma especial el apoyo de mis compañeros de laboratorio, Nerea Iturrioz, Elena Navarro, Lourdes Valdivia, Lorena G. Hevia, Lorena González y Carlos Renero. A lo largo de estos años nos hemos hecho más que compañeros de trabajo, sé que me llevo un amigo en cada uno de vosotros, de esos que duran para el resto de la vida. Una mención especial se merece Esperanza Padín, compañera de estudios, de trabajo y de vida... porque estemos donde estemos, las dos sabemos que siempre estaremos cerca. Gracias también por su apoyo y paciencia a mis amigos Juan Manuel Franco y Paula Rodríguez, porque aunque fuera del ámbito científico, su apoyo psicológico ha sido esencial en este tiempo.

Doy las gracias a mi otro y no menos importante compañero de vida, Fernando, porque hay personas que nos marcan a fuego, como si se enquistaran en nuestro ADN convirtiéndose en parte de nosotros mismos. Gracias por darme ese impulso para lograr alcanzar este gran objetivo, gracias por suponer una de mis principales motivaciones en la vida.

Estaré eternamente agradecida a mi familia, a mis hermanos y sobre todo a mis padres, José y Estrella, por educarme como persona y en gran medida como profesional, ayudándome a lo largo de mi vida a cumplir mis sueños y brindándome la oportunidad de ser libre en cuanto al camino de mi formación académica. Este trabajo es tan mío como vuestro.

Por último, dar las gracias a la Universidad de Cantabria por la beca predoctoral concedida para poder realizar esta tesis doctoral y a los proyectos de investigación PI13/01074 (AES 2013), PI16/00496 (AES 2016) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Fondos FEDER. Junto con el Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) por su ayuda económica para el desarrollo de este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo.
5-FU-MWCNTs	Nanotubos de Carbono de pared Múltiple funcionalizados con 5-Fluorouracilo.
5-TAMRA	5(6)-Carboxitetrametilrodamina N-succinimidil ester.
Acetil CoA	Acetil coenzima A.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosín difosfato.
AFM	Microscopía de fuerza atómica.
APTS	(3-Aminopropil)triethoxisilano.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato.
Bcl-2	Familia de proteínas anti-apoptóticas codificadas por el protooncogen <i>B-cell lymphoma 2</i> .
CaCl₂	Cloruro cálcico.
CH₂THF	5,10-metilentetrahidrofolato.
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
DCC	Diciclohexilcarbodiimida.
dCTP	Desoxicitidina trifosfato.
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato.
DHFU	Dihidrofluorouracilo.
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina.
DMEM	Del inglés <i>Dulcobecco's modified Eagle médium</i> . Medio de Eagle Modificado de Dulbecco.
DMF	N,N-dimetilformamida.
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa.
dTMP	Deoxitimidina monofosfato.
dTTP	Deoxitimidina trifosfato.

dUMP	Deoxiuridina monofosfato.
dUTP	Deoxiuridina trifosfato.
DWCNTs	Del inglés <i>Double-Wall Carbon Nanotubes</i> . Nanotubos de carbono de pared doble.
EPA	Agencia de protección del medio ambiente.
EtOH	Etanol.
FBS	Del inglés <i>Fetal bovine serum</i> . Suero Fetal Bovino
FdUDP	Fluorodeoxiuridina difosfato.
FdUMP	Fluorodesoxiuridina monofosfato.
FdUTP	Fluorodesoxiuridina trifosfato.
FITC	Fluoresceína isotiocianato.
FUDP	Fluoridina difosfato.
FUMP	Fluoridina monofosfato.
FUTP	Fluoridina trifosfato.
GDP	Guanosín difosfato.
GLUT1	Transportador de glucosa 1.
GLUT3	Transportador de glucosa 3.
GTP	Guanosín trifosfato.
GTPasa	Guanosina trifosfatasa.
HBSS	Del inglés <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> .
HCl	Ácido clorhídrico.
HIF-1	Factor 1 Inducible por Hipoxia.
hMPO	Mieloperoxidasa humana.
HNO₃	Ácido nítrico.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
HOCl	Ácido hipocloroso.
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.
H₂SO₄	Ácido sulfúrico.

IMDM	Del inglés <i>Iscove's modified dulcobeco's médium</i> . Medio iscobes de dulbecco modificado.
IC₅₀	Del inglés <i>half maximal inhibitory concentration</i> .
IR	Infrarrojo.
KBr	Bromuro potásico.
K₂HPO₄	Hidrógeno-ortofosfato dipotásico.
MDR	Del inglés <i>Multiple Drug Resistance</i> . Proteínas de resistencia a múltiples drogas.
MOMP	Del inglés <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i> . Permeabilización de la Membrana Mitocondrial Externa.
MWCNTs	Del inglés <i>Multi-Wall Carbon Nanotubes</i> . Nanotubos de carbono de pared múltiple.
NaCl	Cloruro sódico.
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada).
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida).
NaN₃	Azida sódica.
NaOH	Hidróxido sódico.
NH₃	Amoníaco.
NH₄OH	Hidróxido de amonio.
NMs	Nanomateriales.
NTCs	Nanotubos de carbono.
OMS	Organización mundial de la salud.
o-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados.
2h o-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados durante 2 horas.
9h o-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados durante 9 horas.
p53	Gen p53 que codifica para proteína supresora de tumores p53 de 53 kDa.
PAMAM	Poliamidoamina.
PBS	Tampón fosfato salino.
PBS-T	Tampón fosfato salino-tritón.

PDDA	Poli(dialildimetilamonio).
PDI	Proteína disulfuro-isomerasa.
PEG	Polietilenglicol.
PEI	Polietilenemina.
PLL	Poly-L-Lisina.
p-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple prístinos.
PSS	Poli(sodio 4 estirenosulfonato).
RB	Proteína supresora de tumores asociada al retinoblastoma.
RBITC	Isotiocianato de rodamina B.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SAC	Del inglés <i>Spindle assembly checkpoint</i> . Punto de control del ensamblaje del huso mitótico.
SEEA	Servicio de estabulación y experimentación animal.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
SiO₂ MP	Sílice mesoporosa.
SOD	Superóxido dismutasa.
SWCNTs	Del inglés <i>Single-wall carbon Nanotubes</i> . Nanotubos de carbono de una única pared.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
TEOS	Tetraetilortosilicato.
TGA	Análisis termogravimétrico.
THF	Tetrahidrofurano.
TS	Enzima timidilato sintasa.
USCS	Unidad de citometría de flujo y separación celular.
UV	Ultravioleta.
VEGF	Del inglés " <i>Vascular Endothelial Groth Factor</i> ". Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

ÍNDICE

Summary	1
I. Introducción.....	3
1.1. Cáncer.....	5
1.1.1. Señales distintivas del cáncer.....	6
1.1.1.1. Inestabilidad y mutación genómica.....	7
1.1.1.2. Resistencia a la muerte celular.....	7
1.1.1.3. Evasión de la expresión de los genes supresores del crecimiento y mantenimiento de la proliferación celular.....	8
1.1.1.4. Camuflaje del sistema inmune.....	9
1.1.1.5. Adquisición de inmortalidad replicativa.....	10
1.1.1.6. Inflamación promotora de tumores.....	10
1.1.1.7. Inducción de angiogénesis.....	10
1.1.1.8. Desregulación del metabolismo energético.....	11
1.1.1.9. Activación de mecanismos de invasión y metástasis.....	13
1.1.2. Terapias tradicionales.....	14
1.1.2.1. Quimioterapia citotóxica.....	15
1.1.3. Un nuevo horizonte en las terapias tradicionales contra el cáncer.....	23
1.2. Nanomedicina.....	23
1.2.1. Nanomateriales.....	25
1.2.1.1. Clasificación de los nanomateriales.....	25
1.2.1.2. Nanotubos de carbono.....	27
1.2.1.3. Partículas de sílice mesoporosa.....	42
1.2.1.4. Sistema multiestructurado de liberación de multiterapias.....	46
II. Objetivos.....	47
2.1. Objetivo general.....	49

2.2. Objetivos específicos.....	49
---------------------------------	----

III. Materiales y Métodos..... 51

3.1. Nanomateriales.....	53
--------------------------	----

3.1.1. Nanotubos de Carbono.....	53
----------------------------------	----

3.1.1.1. Oxidación de Nanotubos de carbono multipared prístinos.....	53
--	----

3.1.1.2. Funcionalización no covalente.....	53
---	----

3.1.1.3. Funcionalización covalente de o-MWCNTs con 5(6)-carboxitetrametilrodamina N-succinimidil ester (5-TAMRA):.....	55
---	----

3.1.1.4. Liberación de 5-TAMRA <i>in vitro</i>	56
--	----

3.1.2. Partículas de Sílice Mesoporosa (SiO ₂ MP).....	56
---	----

3.1.2.1. Procedencia de los reactivos utilizados.....	56
---	----

3.1.2.2. Síntesis de SiO ₂ MP.....	57
---	----

3.1.2.3. Proceso de calcinado.....	57
------------------------------------	----

3.1.2.4. Sellado y recubrimiento de las partículas de SiO ₂ MP con o-MWNTs.....	58
--	----

3.1.3. Caracterización de los nanomateriales.....	59
---	----

3.1.3.1. Espectroscopía Raman.....	59
------------------------------------	----

3.1.3.2. Espectroscopía Infrarroja.....	61
---	----

3.1.3.3. Espectroscopía de Fluorescencia.....	61
---	----

3.1.3.4. Análisis Termogravimétrico y Espectrometría de Masas.....	62
--	----

3.1.3.5. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	63
--	----

3.2. Cultivos celulares.....	64
------------------------------	----

3.2.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	64
---	----

3.2.2. Extracción de MWCNTs del interior de las células.....	65
--	----

3.2.3. Contaje y viabilidad celular.....	65
--	----

3.2.4. Citometría de flujo.....	66
---------------------------------	----

3.2.5. Microscopía de contraste de fases.....	67
---	----

3.2.6. Inmunofluorescencia.....	67
---------------------------------	----

3.2.7. Microscopía de epifluorescencia convencional.....	68
--	----

3.2.8. Microscopía láser-confocal.....	68
3.3. Modelo animal.	69
3.3.1. Modelo murino <i>in vivo</i>	69
3.3.2. Generación de tumores por alotrasplantes en ratones.....	69
3.4. Análisis estadístico.	71
IV. Resultados y Discusión.	73
4.1. Nanotubos de carbono como nanotransportadores del 5-FU. Estudio del efecto sinérgico entre ambos.	75
4.1.1. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con 5-FU.....	81
4.1.1.1. Microscopía electrónica de transmisión.....	81
4.1.1.2. Análisis termogravimétrico.....	83
4.1.1.3. Espectroscopía de fluorescencia.	84
4.1.2. Liberación <i>in vitro</i> del 5-FU.....	88
4.1.3. Liberación del 5-FU en cultivos celulares y evaluación del posible efecto sinérgico con los MWCNTs.	90
4.1.3.1. Liberación del 5-FU en células HeLa. Efecto sinérgico con los MWCNTs.....	92
4.1.3.2. Liberación del 5-FU en célula de melanoma maligno de ratón (B16F10). Efecto sinérgico con los MWCNTs.	98
4.1.4. Efecto del tratamiento de los 5-FU-MWCNTs en un modelo de tumores sólidos <i>in vivo</i>	102
4.1.5. Discusión de los resultados.	104
4.2. Estudio y mejora de la biodegradación de los MWCNTs manteniendo su efecto antitumoral.	105
4.2.1. Pre-tratamiento oxidativo de los MWCNTs.....	108
4.2.1.1. Reacción de oxidación.....	108
4.2.1.2. Caracterización de la funcionalización química.	108
4.2.2. Los pre-tratamientos oxidativos mejoran la degradación intracelular de los MWCNTs en macrófagos.	113

4.2.3.	Conservación del efecto citotóxico y antitumoral de los MWCNTs oxidados.	119
4.2.4.	Los MWCNTs oxidados se degradan intratumoralmente tras inhibir la progresión del tumor.	123
4.2.5.	Discusión de los resultados.	124
4.3.	Diseño de un nanodispensador de multiterapias basado en el recubrimiento con MWNCTs biodegradables.	125
4.3.1.	Síntesis de un nanodispensador basado en un recubrimiento de nanotubos de carbono biodegradable sobre un núcleo de sílice mesoporosa.	126
4.3.1.1.	Síntesis de SiO ₂ MP.	127
4.3.1.2.	Recubrimiento con MWCNTs biodegradables.	130
4.3.2.	Liberación endolisosomal del sistema SiO ₂ -MWCNT.	132
4.3.3.	Discusión de los resultados.	136
4.4.	Perspectivas futuras.	137
V.	Conclusions.	141
VI.	Referencias.	145
VII.	Artículos.	161

Summary

Carbon nanotubes are nanomaterials with exceptional properties in nanomedicine. These filaments display biomimetic properties with the cytoskeletal protein polymers, mainly microtubules, interfering with the cellular biomechanics, triggering antimigratory, antiproliferative and cytotoxic effects in cancer cells *in vitro*, and antitumoral effects *in vivo*. Besides, carbon nanotubes are also interesting tools for therapeutic delivery since they can move across most cellular barriers, interact with tissues in living organisms, finally translocating inside the cells, where they interact with different organelles. So, carbon nanotubes are capable of promoting the cellular uptake of small drugs and macromolecules (for instance nucleic acids and peptides), so carbon nanotubes are a very interesting tool in the fight against cancer.

In this PhD, I carry out the study of the effect of using carbon nanotubes as drug carriers to potentiate the effects of a commonly used anticancer drug, 5-Fluorouracil. The rationale of the experiment is to block the proliferation of cancer cells at two different points of the cell cycle making more improbable the resistance phenomena that develop in malignant cells and thus, triggering a synergistic effects between the carbon nanotube carrier and the drug in malignant resistant tumours. Here I show how carbon nanotubes potentiate the cytotoxic effect of 5-Fluorouracil *in vitro*, in HeLa and B16F10 cells, producing a blockage in the S phase of the cell cycle, increasing apoptosis and necrotic cells. Besides, we observed that carbon nanotubes enhance the antitumoral effect of 5-Fluorouracil when it is administered physisorbed on their surface.

Unfortunately, the intrinsic properties and bio-persistence of carbon nanotubes, represent a putative hazard that relapses their application as therapies against cancer. In this PhD, I investigate if oxidation treatments improve carbon nanotube intracellular enzymatic digestion, while preserving their morphology, ultimately responsible for their intrinsic anti-cancer properties. Cell imaging techniques and confocal Raman spectroscopic signature analysis revealed that culture macrophages can degrade bundles of oxidized carbon nanotubes (o-MWCNTs) in a few days. Isolation of nanotubes from these phagocytes 96 hours after exposure confirmed a significant reduction of the length of these filaments compared to control extracted from the cell culture medium, or the intracellular pristine carbon nanotubes (p-MWCNTs). More interestingly, *in vivo* single intratumoral injections of oxidized carbon nanotubes triggered ca. 30 % solid melanoma

tumour growth-inhibitory effects while displaying significant signs of biodegradation at the tumoral/peri-tumoral tissues a week after the therapy has had the effect. These results support the potential use of oxidized carbon nanotubes as antitumoral agents and reveal interesting clues of how to enhance *in vivo* carbon nanotube efficient clearance.

The last goal of this PhD was the design and development of a multi-therapies delivery system, taking advantage of the excellent properties of the carbon nanotubes. This nanoencapsulation system, which is denominated SiO₂-MWCNTs, is based on a core of spherical mesoporous SiO₂, covered by biodegradable carbon nanotubes (o-MWCNTs), that achieves all the requirements of a good drug delivery system including: i) specific cell recognition, ii) preservation of the cargo from the hostile lysosomal chemical conditions, iii) non-lethal endo-lysosomal escape, iv) carriage of different particles or chemicals into cytosol, and finally, v) clearance of the delivery vectors to avoid long-term cytotoxicity.

I. Introducción.

“Amamos el pensamiento, amamos la investigación, porque amamos la vida”.

Aristóteles.

1.1. Cáncer.

Los seres vivos han logrado por evolución adaptaciones de una complejidad sobresaliente, sin embargo, siguen siendo vulnerables a las enfermedades. El cáncer es una de las más trágicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y en 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones. Casi una de cada seis muertes en el mundo se debe a esta enfermedad. Se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70 % en los próximos 20 años.

El término cáncer integra a un amplio conjunto de síndromes con muy distintas etiologías, desarrollo y pronóstico. En un cáncer se produce un descontrol de la proliferación celular, haciéndola anárquica, progresiva y destructiva. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan cuando células normales sufren mutaciones. Determinadas mutaciones pueden ser responsables de que una célula se des controle y empiece a multiplicarse sin restricciones, otras mutaciones agravan el problema: pueden permitir que células desorganizadas invadan los tejidos vecinos o se difundan por el organismo colonizando órganos distantes (proceso conocido como metástasis) o pueden hacer que las células tumorales eludan las defensas del sistema inmunitario, e incluso atraigan hacia sí nuevos vasos sanguíneos que las alimenten y les suministren oxígeno (Zimmer, 2007).

En los últimos años, los estudios genómicos del cáncer han mostrado como esta enfermedad desarrolla en nuestro organismo una recreación de la evolución darwinista. El proceso evolutivo tiene lugar cuando se seleccionan aquellas mutaciones asociadas con los fenotipos que provocan que los organismos alcancen un mayor éxito reproductivo. En el caso del cáncer, las mutaciones en el ADN hacen que algunas células se reproduzcan más eficazmente que las células normales, incluso dentro del propio tumor algunas células están mejor adaptadas que otras, de tal forma que se irán seleccionando las células con las mutaciones más agresivas y resistentes (Zimmer, 2007).

Investigaciones recientes han demostrado que, en distintos tipos de tumores primarios, existen diferentes poblaciones celulares que evolucionan de forma totalmente independiente (Figura 1.1). Por ejemplo, se ha demostrado que los procesos de metástasis de muchos pacientes, proceden de poblaciones celulares tumorales minoritarias que se

desarrollaron en estadios tempranos de la enfermedad. Esta heterogeneidad de las células que constituyen un tumor podría explicar la escasa eficacia de las terapias actuales contra el cáncer a largo plazo. Teniendo en cuenta esto, la obtención de la biopsia de una sola muestra del tumor resultaría insuficiente, y este problema repercutiría en la posterior elección del tratamiento aplicado al paciente (Varela, 2007), (Gerlinger *et al.*, 2012).

Se puede concluir que el cáncer es un ecosistema dinámico con diferentes poblaciones celulares que aparecen, evolucionan y desaparecen, al igual que las especies de nuestro planeta evolucionan mediante selección natural, como postuló Charles Darwin. Todo esto lleva a la búsqueda de métodos alternativos para su tratamiento (Varela, 2007).

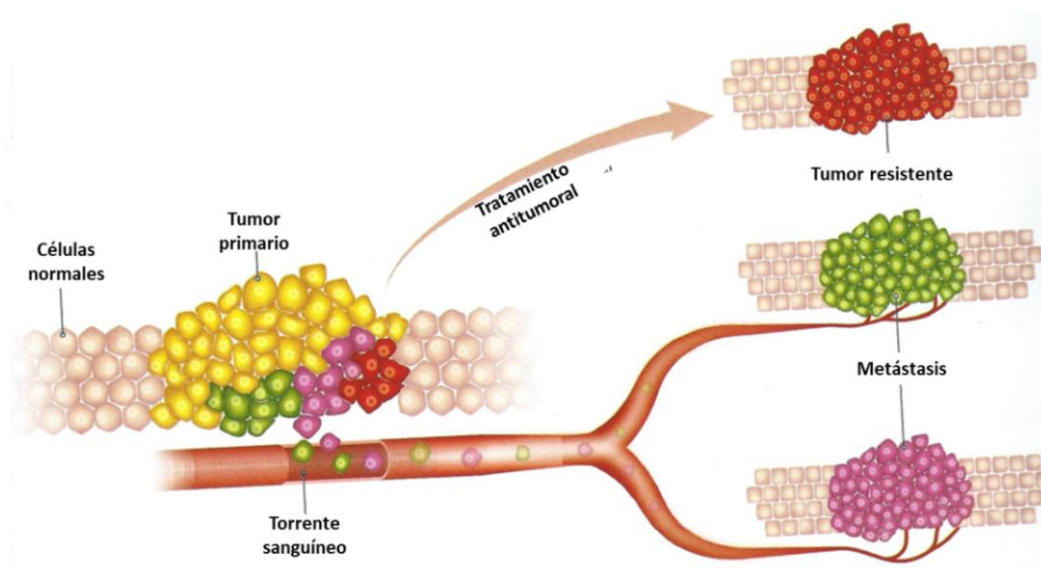


Figura 1.1. Representación esquemática del desarrollo de la heterogeneidad celular dentro de un tumor. El tumor primario se desarrolla dentro del tejido sano como un conjunto de poblaciones celulares diferentes entre sí (masa de células amarillas, verdes, rosas y rojas), todas ellas procedentes de una célula común. A pesar de que el tumor primario está formado por una población mayoritaria (células amarillas), son determinadas poblaciones minoritarias las que se vuelven resistentes al tratamiento (células rojas). Otras poblaciones adquieren las mutaciones necesarias para poder escaparse al torrente sanguíneo y colonizar órganos distantes provocando metástasis (células rosas y verdes). Adaptada de la ref. (Varela, 2007).

1.1.1. Señales distintivas del cáncer.

En los últimos años se ha avanzado enormemente en el estudio y conocimiento del cáncer. La recopilación de toda la información disponible llevó a Hanahan y Weinberg a identificar la existencia de una serie de características comunes que son distintivas de las

células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 1.2). A continuación, se estudia brevemente cada una de ellas.

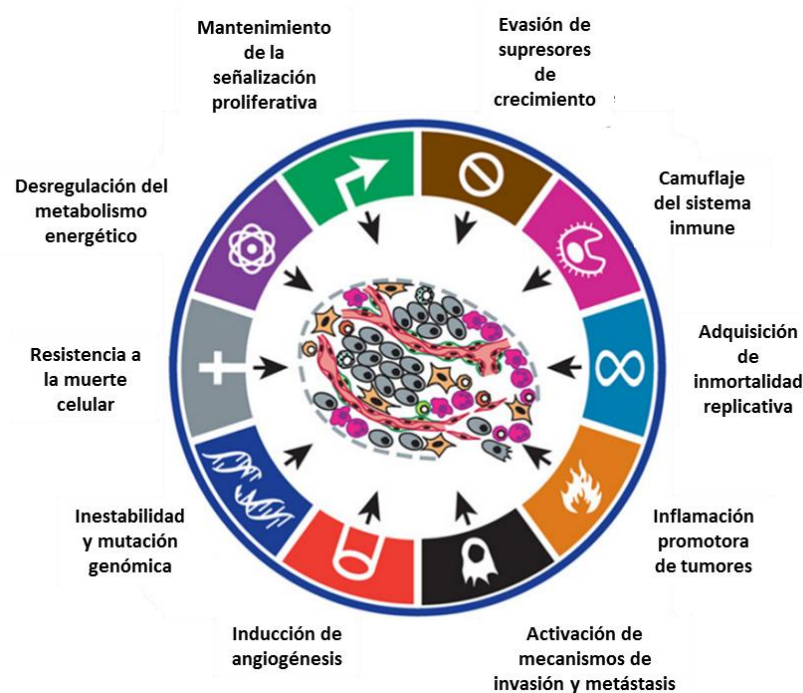


Figura 1.2. Señales distintivas del cáncer. Adaptada de la ref. (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.1.1. Inestabilidad y mutación genómica.

Se habla de inestabilidad genómica cuando se producen variaciones a nivel cromosómico (como deleciones o traslocaciones) o a nivel de ADN en una célula. El mantenimiento de la estabilidad genómica tiene una vital importancia para la supervivencia celular. La extraordinaria capacidad de los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y resolver los defectos en el ADN, aseguran que las tasas de mutaciones espontáneas sean muy bajas durante cada generación celular. Sin embargo, en el caso de las células cancerígenas hay fallos en uno o varios de los mecanismos de la maquinaria de mantenimiento genómico, lo que conlleva la acumulación de múltiples mutaciones y reordenamientos cromosómicos.

1.1.1.2. Resistencia a la muerte celular.

La apoptosis o muerte celular programada, es uno de los mecanismos de control de la división celular aberrante que da lugar a la inestabilidad genómica. Cuando una célula acumula mutaciones irreparables que ponen en peligro la viabilidad funcional y

proliferativa, se desencadena la apoptosis y se produce la muerte celular. La vía intrínseca más relevante por la que se lleva a cabo la apoptosis, implica que se rompa el equilibrio entre proteínas pro- y anti-apoptóticas, favoreciéndose la generación de proteínas pro-apoptóticas y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, del inglés *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). Todo esto desemboca en la activación de caspasas, enzimas pertenecientes al grupo de las proteasas, que culminan la tarea de la muerte celular en cuestión de minutos (Juin *et al.*, 2013), (Lopez, 2015), (Koff *et al.*, 2015).

Las células tumorales envuelven una variedad de estrategias para limitar o eludir la respuesta apoptótica (Lopez, 2015), (Koff *et al.*, 2015), (Ahmed Fouad & Aanei, 2017), la más común es la pérdida de la función del supresor tumoral pro-apoptótico p53. Alternativamente, los tumores pueden lograr el mismo fin mediante el incremento de la expresión de reguladores anti-apoptóticos (como Bcl-2) (Hanahan & Weinberg, 2011). Ocasionalmente, las células cancerígenas también inhiben la actividad de las caspasas, incluso con la aparición de MOMP (Ahmed Fouad & Aanei, 2017).

Es importante señalar que, aunque el resultado neto de estas alteraciones es el aumento de la supervivencia del tumor, esto no significa que todas las células dentro de un tumor sean insensibles a las señales apoptóticas. Si este fuera el caso, la mayoría de terapias anti-cáncer de hoy en día, las cuales son efectivas porque se basan en inducir la muerte celular, serían inútiles y los tumores llegarían a tamaños absurdos (Labi & Erlacher, 2015). Por el contrario, la apoptosis se presenta continuamente en tumores en crecimiento. De hecho, podría desempeñar un papel evolutivo al eliminar los linajes menos malignos, creando un nicho de predominio de clones mejores adaptados y contribuyendo a la progresión del tumor (Ahmed Fouad & Aanei, 2017), (Labi & Erlacher, 2015).

1.1.1.3. Evasión de la expresión de los genes supresores del crecimiento y mantenimiento de la proliferación celular.

Se han descubierto docenas de genes supresores tumorales que actúan de diversas formas para limitar el crecimiento y la proliferación celular. Los dos supresores tumorales típicos codifican las proteínas asociadas al retinoblastoma (RB), y p53.

La proteína RB recibe señales de diversas fuentes y, en respuesta, decide si debe o no proceder al crecimiento y división celular (Burkhart & Sage, 2008), (Sherr & McCormick, 2002). Mientras que la proteína RB traduce señales que se originan principalmente fuera de la célula, p53 recibe señales de los sensores de estrés intracelulares: si hay un daño genómico excesivo, o si los niveles de glucosa, de promotores de crecimiento o de oxígeno no son óptimos, p53 puede desencadenar la apoptosis.

Las células tumorales acumulan mutaciones en el genoma haciendo que estos sistemas de control de la proliferación celular fallen y, por tanto, los mecanismos de división celular se mantienen permanentemente activados.

1.1.1.4. Camuflaje del sistema inmune.

El sistema inmunitario está exquisitamente adaptado para luchar contra los patógenos. De forma general, la inmunidad innata proporciona una respuesta inflamatoria inicial mediante el ataque indiscriminado a cualquier patógeno invasor. La inmunidad adaptativa o adquirida proporciona una respuesta más tardía, aunque selectiva, dirigida contra un patógeno concreto. En el caso del cáncer, ambos sistemas podrían atacar a las células tumorales, sin embargo, el tumor se protege reclutando las células inmunes innatas para que acelere el proceso canceroso. En primer lugar, una célula del sistema inmunitario innato muestra un fragmento del tumor a las células B y T del sistema adaptativo. En algunos casos, los anticuerpos producidos por las células B y T identifican y destruyen las células tumorales, como harían con un patógeno, pero en otros casos, cuando las células B reciben ciertas señales producen anticuerpos que activan al sistema inmunitario innato para que ayude a las células tumorales a sobrevivir y proliferar (Stix, 2007).

Los antígenos del cáncer son más difíciles de identificar que los de un patógeno, porque las células cancerosas corresponden a versiones mutantes de las propias células del organismo. El sistema inmunitario adaptativo no suele considerarlas foráneas, razón por la cual el tumor engaña al organismo para que desarme la respuesta inmunitaria. Así, los tumores tienden una “emboscada” al sistema inmunitario para promover su propio crecimiento y supervivencia (Stix, 2007).

1.1.1.5. Adquisición de inmortalidad replicativa.

Los telómeros consisten en regiones de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas y que intervienen en la estabilidad estructural de los cromosomas, en la división celular y en el tiempo de vida de las estirpes celulares. En las células normales los telómeros se acortan en cada ciclo replicativo del ADN. Una longitud crítica de los telómeros activa mecanismos de control y tras un número limitado de divisiones las células entran en un periodo senescente.

La telomerasa, que es la enzima que evita el acortamiento progresivo y mantiene la integridad de los telómeros, se encuentra sobre-expresada en un alto porcentaje de tumores, por lo que los telómeros se mantienen en los sucesivos ciclos de división celular, evitando la entrada en senescencia y apoptosis y manteniendo una capacidad de proliferación ilimitada (Blasco, 2005).

1.1.1.6. Inflamación promotora de tumores.

Un tumor no corresponde solo a un montón de células aberrantes; requiere también de un sistema de apoyo, un **microentorno tumoral** que incluya diversos tipos celulares entre los que cabe mencionar fibroblastos anormales, células epiteliales, grasas y células del sistema inmune innato y adaptativo (Hölzel *et al.*, 2013). De hecho, las células de sostén del cáncer pueden llegar a representar hasta más de un 50 % del total de las células del tumor (Gujam *et al.*, 2014).

En el cáncer, se produce un estado de inflamación crónica mediado principalmente por macrófagos y mastocitos que infiltran el tumor y producen factores que promueven el crecimiento celular incontrolado. La inflamación promueve la iniciación tumoral al generar un estrés genotóxico que favorece nuevas mutaciones e incrementa la producción de nuevos vasos sanguíneos (neovasculogénesis) alrededor del tumor. Además, favorece la liberación en sangre de células tumorales circulantes que pueden desencadenar metástasis (Qian & Pollard, 2010), (Schreiber *et al.*, 2011).

1.1.1.7. Inducción de angiogénesis.

Un tumor no puede crecer más de 2-3 mm³ sin la formación de nueva vasculatura. Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno así como la

evacuación de desechos metabólicos y dióxido de carbono (CO_2). La neovasculatura asociada al tumor generada por el proceso de angiogénesis responde a estas necesidades.

Los desencadenantes más importantes de la angiogénesis son la **hipoxia y la acidosis**. La hipoxia es un estado de deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo. El crecimiento tumoral genera hipoxia local que funciona como estímulo para la producción de citoquinas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) que es el principal responsable de inducir el proceso de angiogénesis. La vasculatura tumoral que brota tras este proceso es diferente a la vasculatura normal (Hida *et al.*, 2016). Los vasos se presentan dilatados y tortuosos, el flujo sanguíneo es caótico, lo que conduce a la aparición de más áreas de hipoxia y de acidosis debido a la glucólisis anaerobia; estas condiciones estresantes tienen una serie de efectos que incluyen potenciar aún más la angiogénesis, disminuir la eficacia terapéutica y favorecer la expansión de nuevas mutaciones.

1.1.1.8. Desregulación del metabolismo energético.

La proliferación celular crónica y descontrolada que caracteriza la enfermedad neoplásica implica los correspondientes ajustes del metabolismo energético para impulsar el crecimiento y la división celular. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan glucosa primero a piruvato a través de la glucólisis en el citosol y luego a CO_2 en las mitocondrias. En condiciones anaeróbicas, tras la glucólisis se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias que dependen de la presencia de oxígeno para funcionar.

La **glucólisis** hace referencia a la ruta metabólica por la cual, la glucosa es degradada en una serie secuencial de diez reacciones enzimáticas en dos moléculas de piruvato (Figura 1.3). Esta vía metabólica es independiente de oxígeno, sin embargo el destino del producto final depende de la disponibilidad de oxígeno que exista en el microambiente celular. En condiciones normales de oxígeno, el piruvato es convertido en acetil coenzima A (Acetil CoA), vinculando la glucólisis con el ciclo de Krebs que tiene lugar en la matriz mitocondrial. Por el contrario, en condiciones hipóxicas, el piruvato se reduce mediante la adición de dos átomos de hidrógenos para formar lactato, el cual es liberado al espacio extracelular (Figura 1.3).

Otto Warburg observó por primera vez una característica anómala del metabolismo energético de las células cancerígenas (Warburg *et al.*, 1927), (Warburg, 1956), incluso en presencia de oxígeno, las células tumorales utilizan la glucólisis para obtener energía (**glucólisis aeróbica**) (Figura 1.4).

Esta reprogramación del metabolismo energético es aparentemente contradictoria, en el sentido de que las células cancerosas deben compensar la menor producción de ATP proporcionada por la glucólisis en relación con la fosforilación oxidativa mitocondrial (Figura 1.4). Para compensar esta desregulación energética entran en juego diversos reguladores de la expresión génica como el factor inducible por hipoxia HIF-1, la proteína supresora de tumores p53 o los oncogenes RAS o MYC (Yeung *et al.*, 2008). Así por ejemplo, HIF-1 incrementa la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3, que aumentan substancialmente la importación de glucosa al citoplasma con el correspondiente aumento de energía (Jones & Thompson, 2009). La dependencia de la glucólisis de las células tumorales, se puede ver acentuada bajo las condiciones de hipoxia características de la enfermedad.

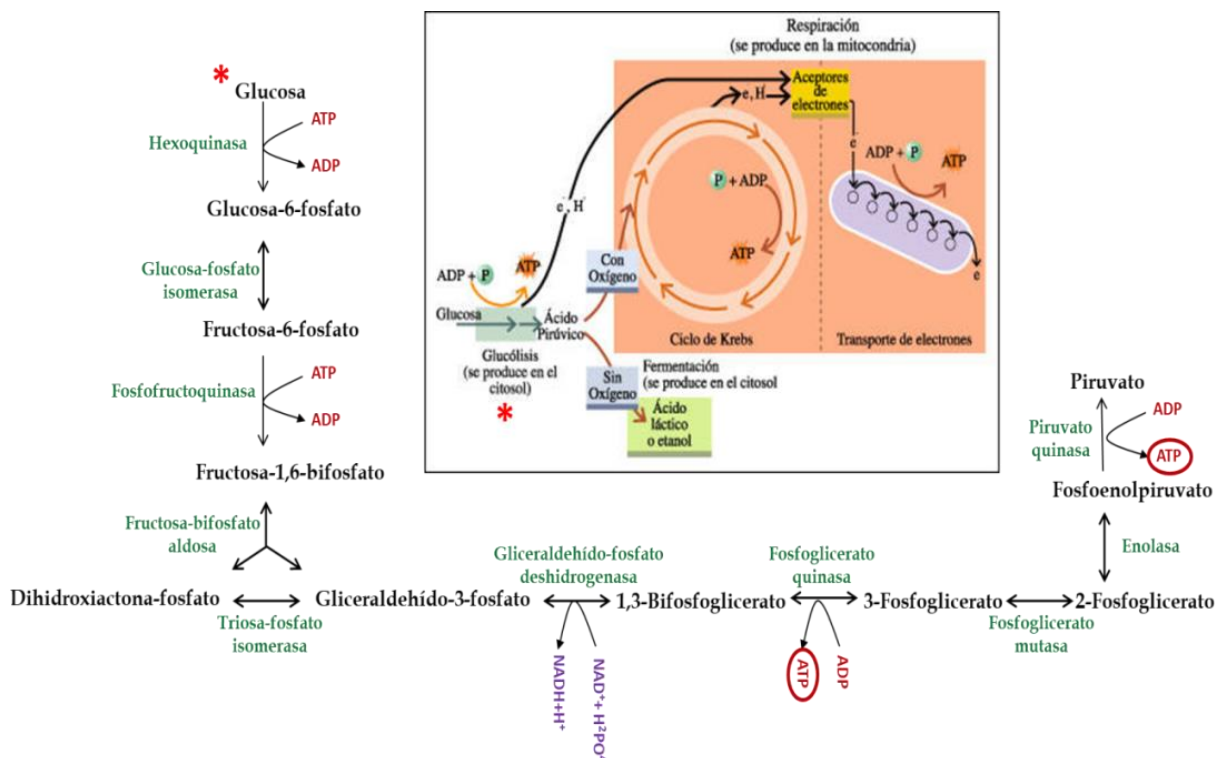


Figura 1.3. Metabolismo de la glucosa. Etapas que tienen lugar para la degradación de la glucosa: glucólisis, formación de Acetil CoA, ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones. El asterisco rojo representa un esquema detallado de las diez reacciones que conforman la glucólisis (Robbins & Cotran, 2006).

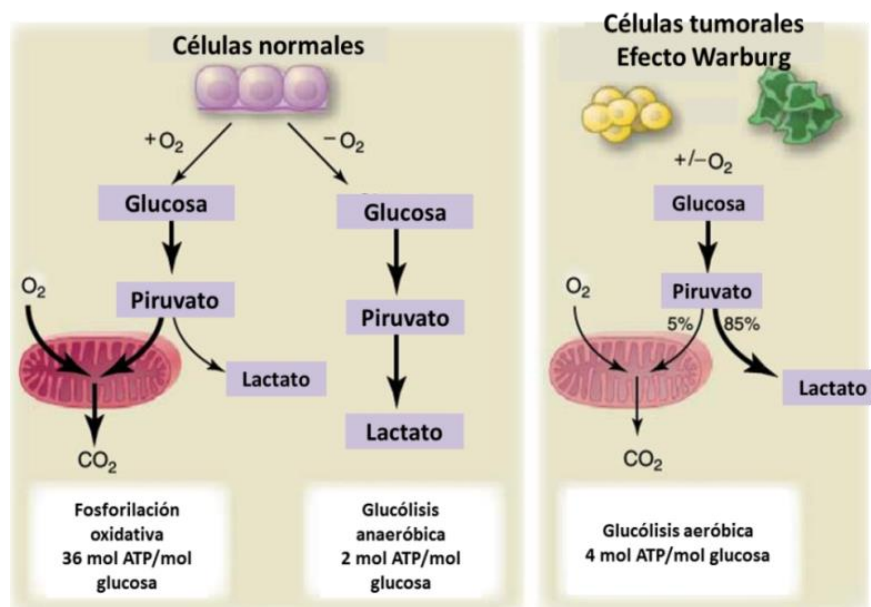


Figura 1.4. Representación esquemática de las diferencias entre fosforilación oxidativa, glucólisis anaeróbica y glucólisis aeróbica (efecto Warburg). La glucólisis aeróbica es menos eficiente en la producción de ATP en relación con la fosforilación oxidativa mitocondrial. Adaptada de la ref. (Vander et al., 2009).

Esta alta tasa de glucólisis da como resultado una gran acumulación de ácido láctico, produciéndose acidosis, patrón metabólico asociado a la transformación y proliferación celular maligna, que a su vez favorece el aumento de más mutaciones.

1.1.1.9. Activación de mecanismos de invasión y metástasis.

Solamente una pequeña población dentro del tumor primario, adquiere las mutaciones necesarias como para poder invadir tejidos circundantes y tejidos distantes, produciendo metástasis. Dentro de estas mutaciones, la más conocida es la que provoca que disminuya la expresión de E-cadherina en carcinomas. Las cadherinas son glucoproteínas transmembranas fundamentales en las uniones célula-célula y entre las células y la matriz extracelular.

Cuando las células normales pierden el contacto con la matriz extracelular o las células vecinas, mueren por **anoikis**, una forma de muerte celular programada (Gilmore, 2005). Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para resistir la anoikis y sobrevivir después de la separación de su matriz mientras viajan a través de los sistemas linfático y circulatorio.

El proceso de invasión y metástasis se puede esquematizar en una secuencia de pasos: 1) invasión a través de la membrana basal y las células estromales, 2) intravasación en la vasculatura tumoral, 3) supervivencia al transporte en circulación, 4) extravasación al parénquima de los órganos distantes y 5) supervivencia y manipulación a microambientes extraños formando micrometástasis que más tarde, 6) pueden convertirse en macrometástasis clínicamente relevantes, a esta última etapa se le conoce como colonización (Massagué & Obenauf, 2016).

1.1.2. Terapias tradicionales.

Los métodos principales que utiliza la medicina actual en su lucha contra el cáncer son **la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia**, siendo esta última el tratamiento más común (Lai *et al.*, 2012). Sin embargo, lejos de ser métodos excluyentes se suelen utilizar de forma complementaria.

Con respecto a **la cirugía** puede emplearse tanto para el diagnóstico como para el tratamiento del cáncer. Las biopsias, consistentes en un estudio de una muestra del tejido, son un ejemplo de su empleo como sistema de diagnóstico. En el caso de su aplicación como tratamiento, la cirugía se suele utilizar en la mayoría de tumores sólidos y consiste en la eliminación del tejido dañado.

Dependiendo del estado del tumor, la cirugía puede ser suficiente para su total desaparición o bien necesita ser combinada con otras terapias. En el caso de que fuera suficiente para la erradicación completa del tumor, la cirugía sería el mejor tratamiento para el cáncer, sin embargo, no siempre es posible aplicarla, debido a que los tumores pueden encontrarse en zonas inaccesibles, o bien puede darse el caso de que no se conozcan con seguridad los límites del tejido dañado, siendo necesario extirpar parte del tejido sano. Por otro lado, como se ha mencionado con anterioridad, las células tumorales tienen el potencial de invadir otros tejidos, provocando metástasis, convirtiéndose así en una enfermedad a nivel sistémico, haciendo que la cirugía se quede corta para su tratamiento. Por lo que se podría concluir que es necesario buscar soluciones alternativas que permitan llegar a todas los nichos cancerosos.

Por otro lado, **la radioterapia** es una técnica basada en el empleo de radiaciones ionizantes: rayos X, protones, etc., (Kaplan, 1970). En su tratamiento contra el cáncer, el paciente se somete a dosis elevadas de radiación, lo cual destruye células cancerosas o

hace más lento su crecimiento al producir daños en el ADN. Sin embargo, esta técnica tiene elevados efectos secundarios debido a que no solamente ataca a las células tumorales, sino también a las células sanas cercanas, que se encuentran dentro de la zona irradiada (Barnett *et al.*, 2009).

Por último, **la quimioterapia** es otra de las técnicas utilizadas para tratar el cáncer, basada en detener la capacidad de crecer y dividirse de las células tumorales (Chabner & Roberts, 2005). Estos fármacos, que reciben el nombre de antitumorales o antineoplásicos, actúan bloqueando la rápida proliferación celular, circulando por el torrente sanguíneo y atacando directamente a las células que están proliferando en forma activa. Dentro de las diferentes técnicas se puede encontrar el tratamiento citotóxico, el tratamiento hormonal y la inmunoterapia. Se explicará a continuación a explicar de forma más detallada el **tratamiento citotóxico**.

1.1.2.1. Quimioterapia citotóxica.

La **quimioterapia citotóxica** es uno de los tratamientos más utilizados actualmente. Se basa en la administración de diversos compuestos químicos cuyo efecto citotóxico induce la apoptosis ante la aparición de daños irreparables en las células (Fesik, 2005). Las principales dianas de acción de estos fármacos son el ADN y los microtúbulos.

i) El ADN.

Estos fármacos actúan lesionando el ADN o impidiendo su división, interfiriendo así en la replicación celular. Se pueden clasificar en diferentes tipos, entre los cuales cabe mencionar los agentes alquilantes, los antimetabolitos, los derivados del platino o los antibióticos citostáticos. En esta tesis, se ha trabajado con el **5-Fluorouracilo** (5-FU), un potente antimetabolito utilizado para el tratamiento de varios tipos de cánceres.

Los antimetabolitos funcionan inhibiendo los procesos biosintéticos esenciales, o incorporándose a macromoléculas, como el ADN o el ARN e impidiendo su normal funcionamiento. El 5-FU hace ambas cosas. El mecanismo del 5-FU se atribuye a la incorporación errónea de fluoronucleótidos en el ADN y ARN y a la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS), encargada de sintetizar nucleótidos (Longley *et al.*, 2003), bloqueando las células principalmente en la fase S del ciclo celular. Este mecanismo se explica con más detalle en el capítulo IV, sección 4.1.

Por otro lado, estos fármacos también afectan indirectamente a la síntesis de proteínas. Las proteínas constituyen la mayor parte de la masa seca de la célula y desempeñan las funciones predominantes de la mayoría de los procesos biológicos, por lo que se puede decir que son biomoléculas esenciales para la supervivencia celular. El ADN no dirige directamente la síntesis de dichas proteínas, sino que utiliza el ARN como intermediario. Para la síntesis de una proteína determinada, la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente de la molécula de ADN se copia primero a ARN en el proceso conocido como **transcripción**. Esas copias de ARN son las que se utilizarán como molde para dirigir la síntesis de proteínas en la **traducción** (Figura 1.5) (Alberts *et al.*, 2010). Es decir, para llevar a cabo la síntesis de proteínas, tanto las moléculas de ADN como de ARN son esenciales. Como las proteínas son vitales para la supervivencia celular, la imposibilidad de sintetizarlas debido a daños tanto en el ADN como en el ARN supone la muerte celular.

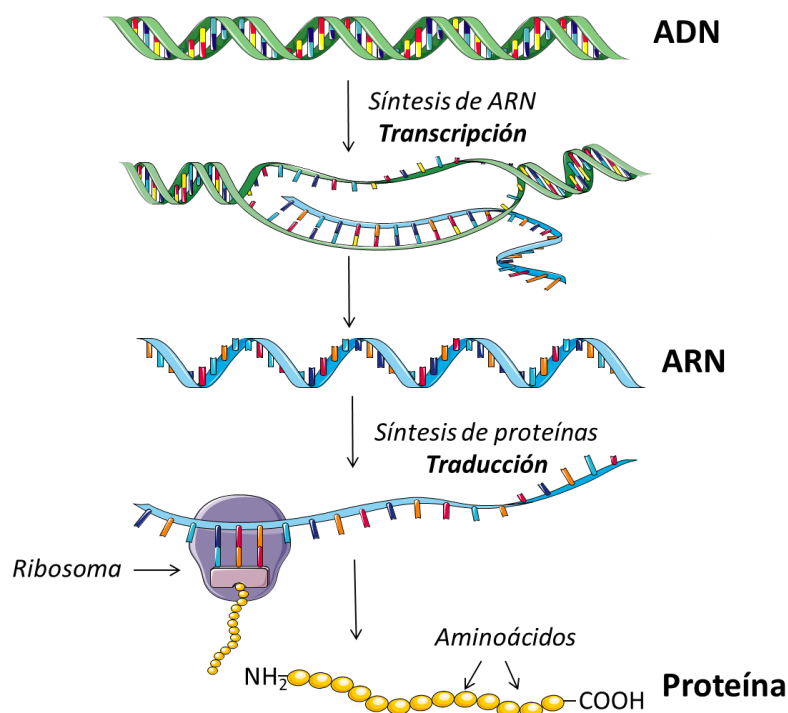


Figura 1.5. Esquema representativo de la síntesis de proteínas. El flujo de información genética va desde el ADN al ARN (**transcripción**). Las proteínas se sintetizan en el ribosoma utilizando como molde las moléculas de ARN (**traducción**).

Por otro lado, el producto final de muchos genes es la molécula de ARN. Como en el caso de las proteínas, muchas de estas moléculas de ARN se pliegan formando estructuras tridimensionales precisas, que desempeñan papeles estructurales, catalíticos y

reguladores dentro de la célula y que también son vitales para el correcto funcionamiento de la misma (Alberts *et al.*, 2010).

ii) Los microtúbulos.

El citoesqueleto celular es fundamental para la organización espacial de las células eucariotas, para la migración y la división celular. Está formado por tres tipos de filamentos: microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedio.

Desde el punto de vista estructural, los microtúbulos muestran una notable organización molecular. Estos filamentos son polímeros tubulares de 25 nm de diámetro, constituidos por heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. La tubulina es una proteína globular de 55 kDa que pertenece a la familia de las GTPasas, proteínas que hidrolizan GTP (guanosín trifosfato) a GDP (guanosín difosfato). La β -tubulina de un dímero interacciona con la α -tubulina del dímero siguiente dando lugar a los protofilamentos (Weisenberg, 1972). Trece de estos protofilamentos se asocian lateralmente para dar lugar al microtúbulo que posee unos 24-25 nm de diámetro externo y 15-17 nm de diámetro interno (Figura 1.6) (Evans *et al.*, 1985), (Nogales *et al.*, 1999), (Amos & Baker, 1979).

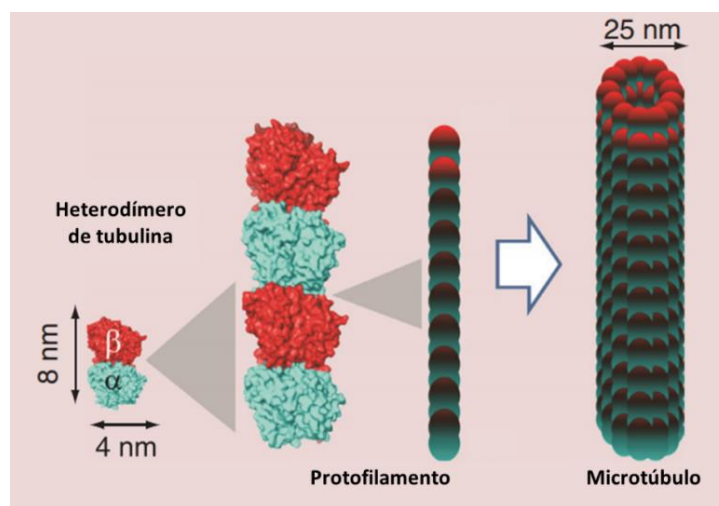


Figura 1.6. Estructura de los microtúbulos. Los microtúbulos están formados por la unión de 13 protofilamentos proteicos, constituidos por la asociación de heterodímeros de tubulina que están formados a su vez por dos polipéptidos diferentes, α -tubulina (azul) y β -tubulina (rojo). Adaptada de la ref. (García-Hevia *et al.*, 2014).

Una de las características principales de los microtúbulos es su comportamiento dinámico. Cada monómero de α o β tubulina tiene un sitio de unión para GTP. El GTP unido al monómero de α -tubulina tiene una función estructural, encargándose de unir a

ambas subunidades de tubulina. Sin embargo, el GTP unido a la β -tubulina se puede hidrolizar, esta hidrólisis modula la adición de nuevos dímeros. En el proceso de polimerización, cuando este dímero se une a un microtúbulo que está creciendo, tiene lugar la hidrólisis del GTP unido a la β -tubulina (Carlier & Pantaloni, 1981). Si la velocidad de adición de dímeros conteniendo GTP es mayor que la de hidrólisis de GTP, el microtúbulo crecerá en longitud (polimerización). Por el contrario, si predomina la hidrólisis de GTP, habrá un momento en el que en el extremo del microtúbulo solo habrá dímeros de tubulina-GDP, desencadenándose la despolimerización abrupta del mismo y la liberación de los dímeros de tubulina-GDP al citosol.

Esta **dinámica de los microtúbulos** es de crucial importancia para llevar a cabo correctamente las distintas funciones celulares de las que son responsables, tales como el mantenimiento de la forma celular, el transporte de vesículas, mitocondrias y otros componentes celulares y muy especialmente en el proceso de formación del huso mitótico durante la mitosis, siendo por tanto unas estructuras clave en el ciclo celular.

El **ciclo celular** es el proceso por el que tiene lugar el crecimiento de la célula y su división en dos células hijas. Las etapas que lo forman son interfase (G1-S-G2) y mitosis (M), (Figura 1.7).

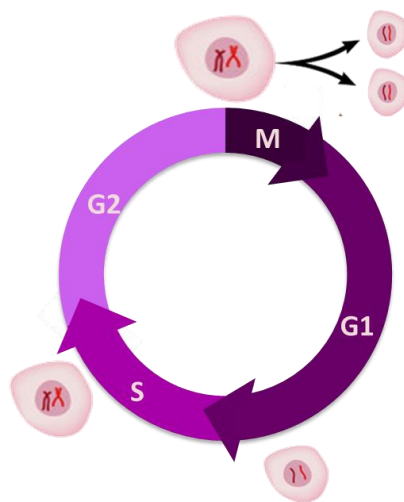


Figura 1.7. Etapas del ciclo celular. El ciclo celular está constituido por la interfase (G1-S-G2) y la mitosis o división celular (M).

La fase G1 es la primera etapa del ciclo celular. En esta etapa se produce la síntesis de ARN y proteínas y la célula duplica su tamaño debido a la continua síntesis de todos sus componentes. Las células en G1, pueden entrar en un estado de quiescencia llamado

G0, en el que no crecen ni proliferan (Vermeulen *et al.*, 2003), como ocurre por ejemplo con las neuronas. Durante esta etapa la carga genética en humanos es de $2n$ (siendo $n=23$). La fase S es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, la cual comienza una vez la célula ha alcanzado el tamaño y el ATP necesario. Por último, la tercera fase del ciclo celular es G2. En ella continúa la síntesis de ARN y proteínas. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. La carga genética durante esta etapa en humanos es $4n$ ($n=23$).

La mitosis o división celular es el proceso en el que una célula se divide dando lugar a dos células hijas idénticas. Consta de diferentes etapas: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 1.8). En este punto, la dinámica de los microtúbulos aumenta de 20 a 100 veces con el fin de dismantlar la red radial de microtúbulos de interfase y reorganizarse ensamblando el huso mitótico (Desai & Mitchison, 1997), (Jordan & Wilson, 2004), (Mitchison & Salmon, 2001).

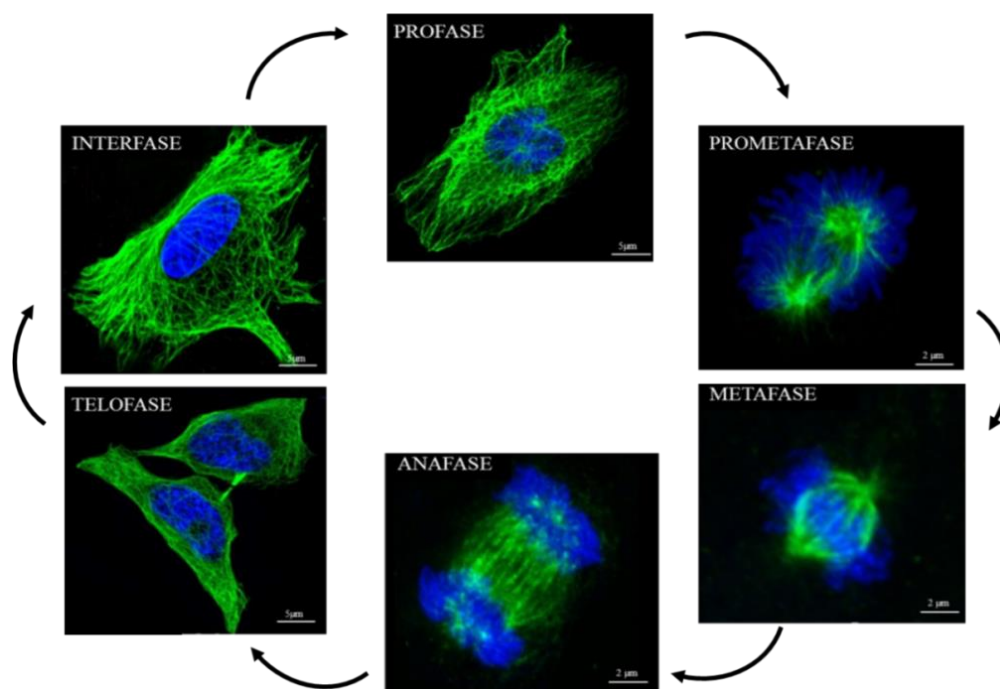


Figura 1.8. Imágenes de microscopía confocal del citoesqueleto microtubular y del ADN durante la división celular. Los microtúbulos se observan por el canal verde mientras que el ADN es visible en el canal azul. En interfase, los microtúbulos se extienden a lo largo de todo el citoplasma celular. En prometafase, las envueltas nucleares se han roto, los cromosomas están condensados y los microtúbulos, muy dinámicos, recorren el citoplasma en busca de los cromosomas. En metafase, los cromosomas se encuentran en el ecuador de la célula para formar la placa metafásica. En anafase, cada copia de cada cromosoma duplicado se separa y se mueven hacia los polos de la célula. En telofase, los cromosomas separados han alcanzado los polos del huso mitótico y la célula madre se está escindiendo para dar lugar a dos células hijas quedando unidas por un “mid-body” que finalmente se separarán en la citocinesis. Adaptada de la ref. (García-Hevia, 2016).

- **Tratamientos tradicionales contra el cáncer basados en la inhibición de la dinámica microtubular.**

Durante las últimas décadas se han utilizado determinados medicamentos antineoplásicos que son eficaces en una amplia gama de tumores. Estos fármacos son una serie de compuestos que típicamente se dirigen a los microtúbulos e interfieren con su dinámica, ya sea como agentes estabilizadores o desestabilizadores de los mismos (Jordan & Wilson, 2004), (Zhou & Giannakakou, 2005). Ambos tipos de fármacos inhiben la correcta alineación de los cromosomas en metafase y el ensamblaje del huso mitótico, comportándose como un veneno que bloquea las células en metafase (Matson & Stukenberg, 2011).

Cuando la mitosis no tiene un desarrollo normal, se activa un mecanismo que controla la correcta alineación de los cromosomas en la metafase, llamado punto de control de ensamblaje del huso (SAC, del inglés *spindle assembly checkpoint*). La activación prolongada del SAC desencadena en la muerte celular por apoptosis, o por otros mecanismos menos entendidos, generalmente conocidos como catástrofe mitótica (Jordan & Wilson, 2004). Esta maquinaria previene la inestabilidad genómica y la aneuploidía (cromosomas aberrantes), y es el mecanismo utilizado por estos fármacos para matar a las células tumorales y vencer el cáncer.

Dado que la división celular es inherente al cáncer, independientemente de la mutación genética particular que ha tenido lugar para que se de la transformación celular, el bloqueo de la proliferación celular al inhibir la dinámica de los microtúbulos es una forma de tratar cualquier tipo de cáncer (Jordan & Wilson, 2004), (Zhou & Giannakakou, 2005). Esta es la razón por la que estos tratamientos antineoplásicos tradicionales están aún en uso. Como se mencionó anteriormente, existen dos grandes familias dentro de este tipo de fármacos, agentes estabilizadores de microtúbulos o inhibidores de la despolimerización, y agentes desestabilizadores de microtúbulos o inhibidores de la polimerización.

Los agentes **estabilizadores de microtúbulos** inducen el ensamblaje de los microtúbulos e impiden su despolimerización. Un ejemplo de ellos sería la familia de los taxanos (paclitaxel, docetaxel y cabazitaxel). Su mecanismo de acción consiste en unirse a un “bolsillo” estructural situado en el lateral de la subunidad β -tubulina (Figura 1.9), favoreciendo así la estabilidad de los contactos laterales entre protofilamentos

(Li *et al.*, 2002). Los microtúbulos ensamblados en presencia de estos fármacos, son cortos, estables y muestran una organización aleatoria en la célula (De Brabander *et al.*, 1981). Este hecho da lugar a la formación de husos mitóticos aberrantes, a menudo multipolares, lo que lleva al bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M y por último a la muerte de la célula por apoptosis (Alberti, 2009). Los taxanos son activos contra muchos tipos diferentes de cánceres, incluidos los cánceres de mama, esófago, gástrico, cabeza-cuello, ovario, pulmón y próstata, y se suelen combinar con radioterapia neoadyuvante.

Por otro lado, se encuentran los **agentes desestabilizadores de microtúbulos** o inhibidores de la polimerización. Entre ellos cabe destacar la Colchicina y análogos, tales como los alcaloides de la Vinca. Estos fármacos se unen al polipéptido de β -tubulina, concretamente a la región de interacción entre los dos heterodímeros de tubulina, evitando así la formación de los protofilamentos (Figura 1.10) (Chen *et al.*, 2009). Este proceso conduce a la despolimerización de la matriz de microtúbulos, bloqueando la división celular y provocando la detención de la metafase y finalmente la muerte celular.

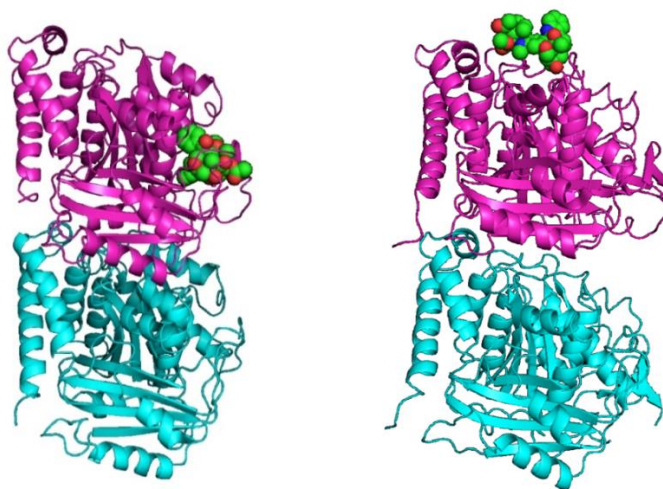


Figura 1.9. Tipo de fármacos antineoplásicos. (Izquierda) agente estabilizador de microtúbulos. El Taxol (verde) se une a un bolsillo estructural de la subunidad de β -tubulina (rosa), inhibiendo la despolimerización. (Derecha) agente desestabilizador de microtúbulos. El fármaco (Vinblastina) se une a la β -tubulina (rosa) en una región de interacción con la α -tubulina del siguiente heterodímero, inhibiendo la polimerización. Adaptada de la ref. (García-Hevia *et al.*, 2014).

iii) Inconvenientes de los fármacos antineoplásicos.

Como dijimos previamente, los fármacos antineoplásicos circulan por el torrente sanguíneo y actúan bloqueando la proliferación celular, dañando directamente a todas las células que están proliferando de forma activa. En general, las células cancerígenas son las

que más crecen y se dividen, por lo que son las más susceptibles a éstos fármacos, sin embargo, no son las únicas. De esta manera, los fármacos antitumorales utilizados en los tratamientos actuales contra el cáncer, no tienen la capacidad de distinguir entre células sanas y cancerígenas, por lo que tienen **importantes efectos secundarios**.

Por otro lado, las células cancerígenas han encontrado diversas formas de resistencias a la quimioterapia. La **quimioresistencia** constituye una falta de respuesta a la inhibición del crecimiento tumoral inducida por los fármacos, y se ha convertido en una de las principales causas de las muertes por cáncer. Los principales mecanismos de resistencia se resumen a continuación (Luqmani, 2005):

- **Alteración del transporte del fármaco a través de la membrana plasmática.** Esta es probablemente una de las formas más significativas de resistencia contra los agentes antineoplásicos. La lleva a cabo un grupo de proteínas de membrana que expulsan moléculas citotóxicas al medio extracelular, manteniendo la concentración intracelular de fármaco por debajo del umbral de destrucción. Dentro de estas proteínas cabe destacar las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR, del inglés *multiple drug resistance*) que se encuentran sobre-expresadas en una gran variedad de tumores, como el de pulmón, hepatomas o carcinomas de colon.
- **Respuestas genéticas.** Determinados medicamentos inhiben enzimas claves en las vías que controlan la proliferación celular. Sin embargo, pueden producirse modificaciones que provoquen un aumento de la transcripción del gen que codifica dichas enzimas. Como la concentración intracelular del fármaco es limitada, no es posible bloquear las cantidades de enzima adicionales que se sintetizan y, por tanto, la célula será capaz de sobreponerse a los efectos inhibitorios.
- **Mejoras en la reparación del ADN.** Otra forma en que las células pueden volverse resistentes, es mediante el desarrollo de una capacidad mejorada para reparar y eliminar las lesiones inducidas por fármacos que actúan sobre el ADN a través de la acción de proteínas reparadoras del ADN.
- **Alteraciones en las moléculas diana.** Es posible que, durante el transcurso de la terapia, la diana de los fármacos utilizados pueda modificarse de alguna manera y, por tanto, dejar de ser un objetivo útil para bloquear la división celular. Así por ejemplo, pueden tener lugar mutaciones o modificaciones postraduccionales en el sitio de unión de

los fármacos antimetabólicos a la molécula de tubulina impidiendo dicha unión (Orr *et al.*, 2003), (Giannakakou *et al.*, 1997).

- **Efectos metabólicos.** Otra respuesta fisiológica a la presencia de fármacos es la sobre-expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos o moléculas transportadoras; por ejemplo, el aumento de la producción de glutatión o ubiquitina contribuye a la inactivación del fármaco al formar conjugados que son fácilmente excretados.

Como hemos visto, los mecanismos tradicionales de combatir el cáncer no son del todo eficientes debido a la gran cantidad de efectos secundarios que producen y al desarrollo de mecanismos de resistencia, por lo que urge buscar nuevas terapias que acompañen o sustituyan a estos fármacos en la lucha contra el cáncer.

1.1.3. Un nuevo horizonte en las terapias tradicionales contra el cáncer.

El uso de **Nanomateriales** (NMs) en medicina tiene el potencial de transformar radicalmente no solo los tratamientos antineoplásicos (Schroeder *et al.*, 2012), (Farokhzad *et al.*, 2006), (Sailor & Park, 2012), sino también el diagnóstico por imagen (Bae *et al.*, 2011), los sistemas de transporte y administración de fármacos (Bourzac, 2012), (Madani *et al.*, 2011), los biosensores (Sokolov, 2013), (Jaque *et al.*, 2014), etc. Existen además muchos ejemplos en la literatura que muestran cómo algunos nanomateriales podrían emplearse como nanocápsulas, ya que pueden penetrar a través de tejidos y entrar en el interior de las células, y desde allí detectar y tratar enfermedades (Lacerda *et al.*, 2012), (Yehia *et al.*, 2007). Todo esto lleva a pensar en la **Nanomedicina** como terapia adyuvante, la cual ofrece la posibilidad de complementar y mejorar los tratamientos tradicionales contra el cáncer, usados en la actualidad.

1.2. Nanomedicina.

En 1959, en una ponencia titulada “*There is plenty of room at the bottom*” (hay mucho espacio en el fondo), el físico y Premio Nobel Richard Feynman propuso un nuevo campo de estudio para la ciencia: la tecnología a escala atómica y molecular. “*Los principios de la física, que yo sepa, no están en contra de la posibilidad de manipular cosas átomo por átomo*”

afirmó Feynman, dejando el campo abierto para quien quisiera explorarlo. Este hecho suscitó el interés por el desarrollo de la tecnología a una escala diminuta.

La **Nanotecnología** es la ciencia encargada del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de los **nanomateriales**. El prefijo *nano-* hace referencia a la milmillonésima parte de un metro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). En la Figura 1.10 se puede comprobar cómo este tamaño se corresponde con el de muchas estructuras biológicas, lo que junto con su morfología, permite a los nanomateriales interactuar con polímeros, proteínas, ADN, etc., interfiriendo en numerosos procesos celulares.

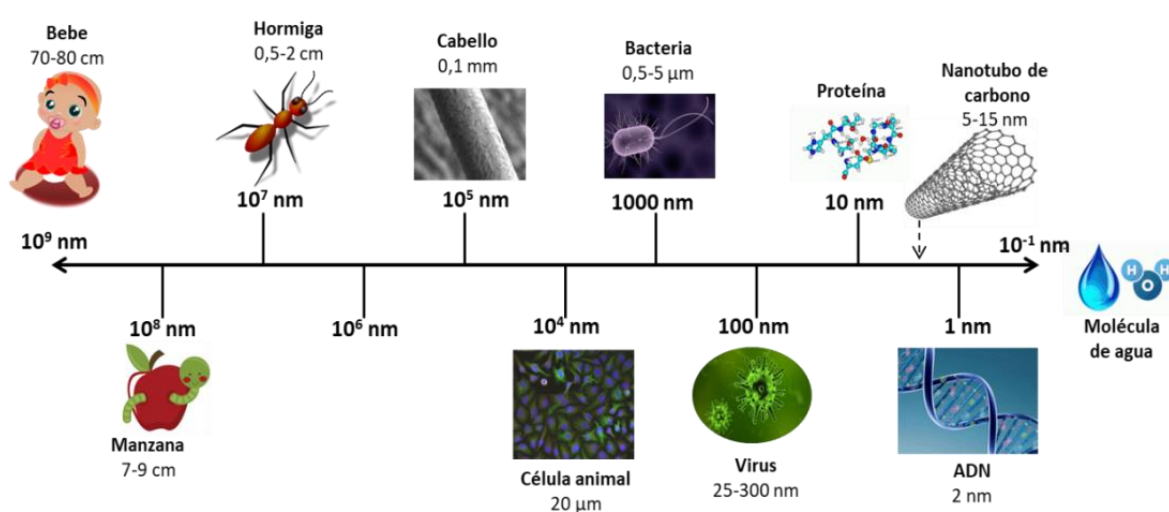


Figura 1.10. Escala representativa de diferentes tamaños relacionados con el contexto biológico y con los nanomateriales.

Para comprender el potencial de la nanotecnología, es clave saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad y la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hacen a escala macroscópica.

La **Nanomedicina** es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina. En 2004 el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU firmó la alianza para el uso de la nanotecnología en el cáncer, desarrollando una nueva convergencia entre la nanotecnología y la medicina como campo de investigación multidisciplinar.

1.2.1. Nanomateriales.

Se define nanomaterial como aquel material que en al menos una de sus dimensiones tiene un tamaño inferior a 100 nm. Se puede decir que existen nanomateriales desde el origen de los tiempos, como los virus o el ADN, aunque sólo desde este último cuarto de siglo ha sido posible modificar las estructuras moleculares de manera deliberada dentro de este tamaño.

Como se indicó previamente, la cualidad más importante y sorprendente de los nanomateriales es el cambio que sufren sus propiedades físico-químicas cuando se trabaja a esta escala. Una de las propiedades más destacables es su elevada relación superficie/volumen, que propicia la aparición de nuevos efectos mecánico-cuánticos y hace que todas las características relacionadas con la superficie sean bastante diferentes a las del mismo material con mayor tamaño.

Por otro lado, el tamaño es un parámetro clave que afecta a la tasa de captación por parte de la célula (Gratton *et al.*, 2008) y es una propiedad clave para la vida media de circulación *in vivo*. Por su parte, la carga superficial del nanomaterial es un factor tremendamente importante que contribuye a la unión de éste con proteínas y compuestos existentes en el medio (Wang *et al.*, 2011). De hecho, la modificación superficial de los nanomateriales (**funcionalización**), es un área de intensa investigación para conseguir un correcto direccionamiento de éstos hacia el tejido o célula correspondiente, mediante una unión específica con los receptores celulares. Además, los nanomateriales pueden interaccionar con los componentes intracelulares de similares dimensiones rodeándose de una corona de proteínas, que recibe el nombre de **biocorona** (Sengupta *et al.*, 2015), que los camufla en contextos biológicos confiriéndoles una identidad “bio”. Esta biocorona juega un papel fundamental en la captación celular (Pelaz *et al.*, 2015), así como en la acumulación y la biodegradación de los nanomateriales (Saptarshi *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Clasificación de los nanomateriales.

La gran variedad de nanomateriales existentes se pueden clasificar de muy diversas formas. Se puede hacer una clara diferenciación entre nanomateriales antropogénicos, es decir, aquellos que han sido creados por el hombre o bien que han surgido como resultado de actividades humanas, y nanomateriales naturales, que existen en la naturaleza desde el origen de los tiempos, tales como los virus. Si nos centramos en los

nanomateriales antropogénicos, la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos los clasifica en cuatro tipos **en función de su composición química**:

- **Basados en carbono:** se incluyen en este grupo aquellos nanomateriales compuestos principalmente por carbono. Durante mucho tiempo se conocía que el carbono existía en dos formas alotrópicas naturales, el grafito y el diamante. Sin embargo, más tarde se descubrieron nuevas formas alotrópicas entre las que cabe destacar el grafeno, el fullereno, y los nanotubos de carbono (NTCs) (Figura 1.11), entre otras. Así, el carbono es el elemento químico con una mayor cantidad de alótropos identificados.

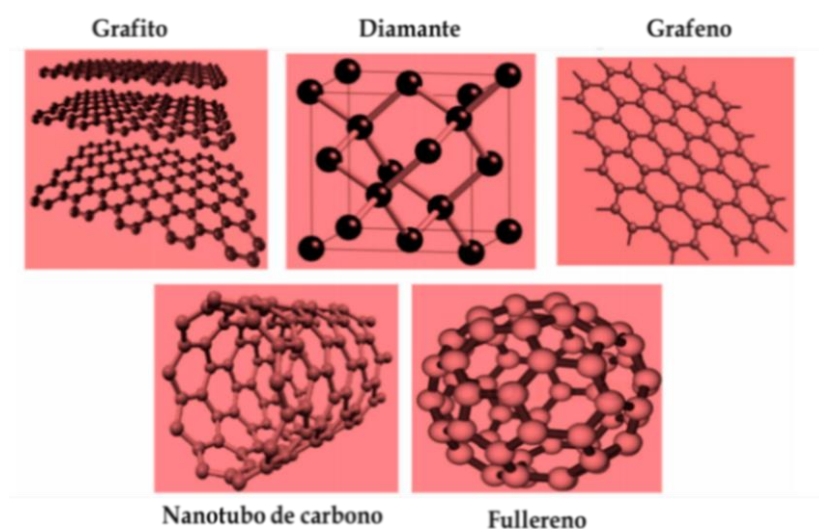


Figura 1.11. Nanomateriales basados en carbono. Estructuras de algunas de las principales formas alotrópicas del carbono. Adaptada de la ref. (Nasir et al., 2018).

El grafeno es la base de todas las formas alotrópicas gráficas encontradas. Si una lámina de grafeno se empaqueta en forma de esfera, da lugar a los fullerenos, si varias capas de grafeno se apilan interaccionando unas con otras mediante enlaces de Van der Waals e interacciones π - π , se obtiene el grafito, mientras que si se enrolla sobre sí misma en forma de cilindro da lugar a los nanotubos de carbono.

- **Basados en metales:** dentro de esta categoría se incluyen los puntos cuánticos, nanopartículas de oro y plata y óxidos metálicos como el dióxido de titanio o el óxido de zinc.
- **Dendrimeros:** se tratan de polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. Presentan forma tridimensional de construcción arborescente.

- **Compuestos:** estos materiales se forman por la unión de dos o más materiales, con el fin de conseguir mejorar las propiedades (por ejemplo, mayor rigidez o dureza, resistencia mecánica, resistencia a la corrosión, menor peso, buen conductor térmico, etc.) de los materiales originales por separado.

A pesar de que existen multitud de nanomateriales, son de especial interés para nosotros los que encuentran aplicaciones en biomedicina y más concretamente en el campo de la oncología. Como vimos anteriormente, el tamaño de los nanomateriales se encuentra en la escala de muchas estructuras biológicas, lo que abre un campo muy interesante en el estudio de la interacción entre nanomateriales y determinadas biomoléculas que tienen un papel relevante en el cáncer. También son de gran interés aquellos nanomateriales que gracias a sus propiedades permiten transportar en su interior o en su superficie determinados fármacos o biomoléculas hacia las células dianas, llevando a cabo una liberación controlada de los mismos, *in situ*. El principal nanomaterial con el que se ha trabajado en esta tesis doctoral son los **nanotubos de carbonos (NTCs)**, que debido a sus excepcionales propiedades físico-químicas puede llegar a jugar un papel muy importante en las terapias alternativas al tratamiento del cáncer.

1.2.1.2. Nanotubos de carbono.

En 1991 Sumio Iijima caracterizó por primera vez mediante microscopía electrónica de alta resolución una nueva forma alotrópica del carbono consistente en láminas de grafeno enrolladas sobre sí misma en forma de tubo, descubriendo así los nanotubos de carbono (Iijima, 1991).

Según el número de capas de grafeno que presenten, se pueden encontrar tres tipos de NTCs (Figura 1.12): de una sola capa (SWCNTs, del inglés *Single-Wall Carbon Nanotubes*), de dos capas (DWCNTs, del inglés *Double-Wall Carbon Nanotubes*) y de varias capas (MWCNTs, del inglés *Multi-Wall Carbon Nanotubes*).

Los SWCNTs son cilindros formados por láminas aisladas de grafeno que se enrollan sobre sí mismas, con diámetros entre 1 y 2 nm. En el caso de los DWCNTs, son dos láminas las que se pliegan en torno a un eje. Los MWCNTs consisten en más de dos láminas de grafeno enrolladas en cilindros concéntricos, con espacios de 0.3-0.4 nm entre las capas (Gong *et al.*, 2005).

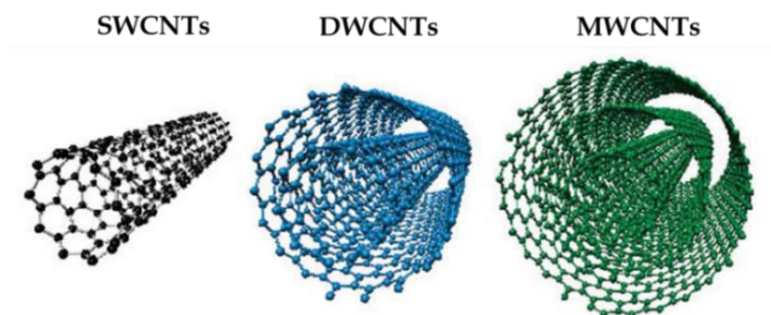


Figura 1.12. Tipos de nanotubos de carbono en función del número de capas de grafeno que lo forman. A la izquierda nanotubo de una sola capa (SWCNT), en el centro de dos (DWCNT) y a la derecha nanotubos de más de dos capas (MWCNT).

i) Propiedades de los NTCs.

Los NTCs están formados por átomos de carbono con hibridación sp^2 . Su composición y estructura hace que presenten **excepcionales propiedades físico-químicas**, a nivel térmico, mecánico, electrónico o de reactividad superficial. De esta forma, este material es una de las fibras más resistentes conocidas hoy en día, de hecho, se encuentra entre los materiales más fuertes en la dirección axial, con un módulo de Young seis veces superior a la del acero de altas prestaciones, y su resistencia a la tracción puede alcanzar más de diez veces la de las fibras más resistentes, además presenta una elevada resiliencia, es decir, tiene una alta capacidad para deformarse y no romperse bajo estrés mecánico (Lu, 1997), (Treacy *et al.*, 1996). Por otro lado, tienen una alta conductividad térmica a temperatura ambiente, y son considerablemente estables térmicamente, soportando temperaturas de 2800 °C en vacío y en torno a 450 °C en presencia de oxígeno. Son buenos conductores de la electricidad, aunque presentan un amplio margen de conductividades en función de su diámetro, quiralidad y número de capas (Hamada *et al.*, 1992).

ii) Aplicaciones de los NTCs.

Las excepcionales propiedades que se han mencionado hacen de los NTCs unos excelentes nanomateriales para ser utilizados en múltiples aplicaciones en muy diversos campos. Una de las aplicaciones de mayor futuro es en el campo de la energía, son buenos candidatos para el desarrollo de supercondensadores (Peng *et al.*, 2007), (Simon & Gogotsi, 2008), (Portet *et al.*, 2007) y en la fabricación de células solares (Yen *et al.*, 2008), (Jia *et al.*, 2008). En el campo de la nano-electrónica también tienen múltiples aplicaciones,

especialmente en la fabricación de memorias informáticas (Jang *et al.*, 2008). Gracias a su elevada área superficial y a su estructura porosa también han mostrado gran potencial en la adsorción de diversas sustancias químicas (Zhong *et al.*, 2009), (Kabbashi *et al.*, 2009), (Yang & Xing, 2009). Cabe destacar también su aplicación como aditivos en composites cerámicos o poliméricos para mejorar sus propiedades (Bokobza, 2007). Por último, en un estudio publicado en 2006 en la revista Nature, se observaron mediante microscopía electrónica de alta resolución NTCs en el acero con el que se forjó una espada de Damasco fabricada en el siglo XVII, esto podría explicar la fortaleza que las hicieron legendarias (Reibold *et al.*, 2006).

Se podrían seguir mencionando más aplicaciones en otros campos, sin embargo, una vez visto una serie de ejemplos representativos de la gran utilidad de este nanomaterial y teniendo en cuenta el objetivo de esta tesis, se pasará a continuación a hablar de las **aplicaciones biológicas de los NTCs**.

iii) Aplicaciones biológicas de los NTCs.

Para que los NTCs puedan tener aplicaciones biológicas, es necesario poder resuspenderlos en medios biológicos, con el fin de evitar la citotoxicidad de los disolventes orgánicos. De esta forma, la funcionalización de los mismos juega un papel fundamental.

La **funcionalización** de los NTCs consiste en su recubrimiento con determinadas moléculas o la modificación química de su superficie. Es crucial para disminuir su toxicidad y ampliar el alcance de sus aplicaciones debido a que mejora su dispersabilidad, aumenta su interacción con los receptores celulares y ayuda a su biocompatibilidad. Se puede hablar de dos tipos de funcionalización, covalente y no covalente.

La **funcionalización no covalente** está basada en interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas o π - π , entre la superficie del nanotubo y determinadas moléculas que lo recubren. Es particularmente interesante debido a que no se altera la estructura electrónica del NTC. Sin embargo, este tipo de funcionalización implica interacciones débiles entre la superficie del nanotubo y las moléculas de interés, por lo que en muchos casos son difíciles de controlar y de caracterizar. Además, la cantidad de moléculas unidas no siempre es calculable. Especialmente en el caso de que la muestra se encuentre en disolución, puede ocurrir que las moléculas de interés sean remplazadas por el disolvente

(Toma, 2009). Aun así, se pueden encontrar muchos trabajos en la literatura basados en la funcionalización no covalente, por ejemplo con proteínas, ADN y otras biomoléculas (Tasis *et al.*, 2006), (Ado Jorio & Dresselhaus, 2008), debido a que es muy sencilla y a que no suele necesitar condiciones agresivas para llevarse a cabo, por lo que se asegura la estabilidad de las moléculas que se quieren unir.

Por otro lado, en la **funcionalización covalente**, las paredes de los NTCs se modifican de forma irreversible (Toma, 2009). En este caso se modifica la estructura electrónica de la superficie del nanotubo, pudiendo alterar sus propiedades electrónicas y ópticas. Las reacciones pueden tener lugar en la pared lateral del nanotubo o en los sitios con defectos generalmente localizados en los extremos de los mismos (Tasis *et al.*, 2006). En la funcionalización covalente se crean defectos estructurales en la pared del NTC de tal forma que pueden aparecer anillos de 5 y 7 carbonos en lugar de 6, hay rehibridación de sp^2 a sp^3 , aparición de grupos -OH, -COOH, -C=O al tratarlos con ácidos, etc.

Como ejemplos de reacciones que actúan sobre la pared lateral del nanotubo cabe mencionar la adición radicalaria a través de una sal de diazonio, o reacciones de cicloadición como la reacción de Prato consistente en una cicloadición 1,3-dipolar (Maggini *et al.*, 1993). Por otro lado, la funcionalización en los extremos de los nanotubos se produce a través de reacciones de amidación o esterificación, o bien mediante la obtención de grupos carboxílicos al oxidar los nanotubos mediante tratamiento con ácidos (Tasis *et al.*, 2006).

Una vez que están correctamente funcionalizados, estos materiales pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de nuevos tejidos y órganos. Se ha visto como los NTCs consiguen imitar el rol del colágeno como soporte en los tejidos óseos, aumentando la resistencia, flexibilidad y biocompatibilidad de los materiales que se utilizan actualmente como prótesis (Zhao *et al.*, 2005). También se han llevado a cabo estudios de NTCs en prótesis visuales (Shoval *et al.*, 2009). Por otro lado, debido a sus propiedades como conductores o semiconductores, se podrían integrar con el tejido nervioso usándolos como *interfaces* neuronales (Serpell *et al.*, 2016). Además, dada su capacidad de entrada rápida en las células presentadores de antígenos, como las células dendríticas, son especialmente útiles como portadores de antígenos, pudiendo comportarse como nanovacunas (Scheinberg *et al.*, 2013), (Gottardi & Douradinha, 2013).

A continuación se procederá a desarrollar las dos aplicaciones biológicas en las que se centra el estudio de la presente tesis doctoral. Aunque a lo largo de la introducción se hable en general de NTCs, todo el trabajo desarrollado en la presente tesis y por tanto, en la literatura en la que se basan estos estudios, se refiere a MWCNTs.

- **NTCs como agentes antineoplásicos.**

Estudios realizados en nuestro laboratorio con anterioridad, demostraron como la mera entrada de los NTCs en las células cancerígenas y su interacción con los múltiples componentes de la misma, ejerce un efecto anti-proliferativo (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012), anti-migratorio (García-Hevia *et al.*, 2015a) y citotóxico (García-Hevia *et al.*, 2015b) en diferentes tipos de células tumorales, dando lugar también a importantes efectos antineoplásicos en tumores de melanoma sólidos en modelos murinos (García-Hevia *et al.*, 2016b).

Algunos estudios sugieren que al menos entre el 30-50 % de los NTCs funcionalizados entran en las células mediante un proceso independiente de energía (Shi *et al.*, 2011). Una vez dentro, pueden dispersarse por el citoplasma, pueden incluirse en estructuras membranosas o pueden interactuar con la envoltura nuclear, entrar en el núcleo e interactuar con el ADN (Lacerda *et al.*, 2012). Los diferentes tipos de NTCs exhiben propiedades fisicoquímicas bastante distintas. Su longitud, diámetro y estado de agregación determinan sus mecanismos de captación celular y su interacción con los diferentes componentes celulares. Entre ellos, hay evidencias de que los NTCs interactúan con el ADN (Li *et al.*, 2006), la actina (Holt *et al.*, 2010), los microtúbulos (Pampaloni & Florin, 2008), etc. Estas interacciones pueden alterar los diversos mecanismos celulares, principalmente la replicación del ADN, la proliferación celular y la migración.

Cabe destacar que los microtúbulos y los NTCs comparten una serie de propiedades. Ambos tienen dimensiones y propiedades de superficie similares. Tanto los NTCs como los protofilamentos que forman los microtúbulos se auto-ensamblan y forman racimos, tienen una alta relación longitud-anchura, muestran una alta elasticidad y resiliencia. Sin embargo, a diferencia de los NTCs, los microtúbulos son altamente dinámicos como dijimos anteriormente, lo cual es crucial para la proliferación celular. La similitud entre ambas estructuras lleva a la interacción biomimética intrínseca de los NTCs con los microtúbulos, lo cual provocaría la inhibición de su dinámica. La

interferencia en la dinámica de los microtúbulos da como resultado un bloqueo en la división celular y una mal segregación cromosómica, que finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis.

Rodríguez-Fernández *et al.* muestran en su trabajo imágenes de Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM) de células HeLa tratadas con NTCs durante 70 h (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012) (Figura 1.13). En ellas observan racimos o “bundles” de NTCs intracelulares (flechas rojas) que se entremezclan y asocian con microtúbulos (flechas blancas) alrededor del núcleo. Estos racimos de NTCs han sido observados en otros trabajos rodeados por una membrana, o bien dentro del núcleo, interactuando con la cromatina (Lacerda *et al.*, 2012), (Porter *et al.*, 2007). Estos hallazgos confirman que los NTCs entran en las células e interfieren con los filamentos allí presentes.

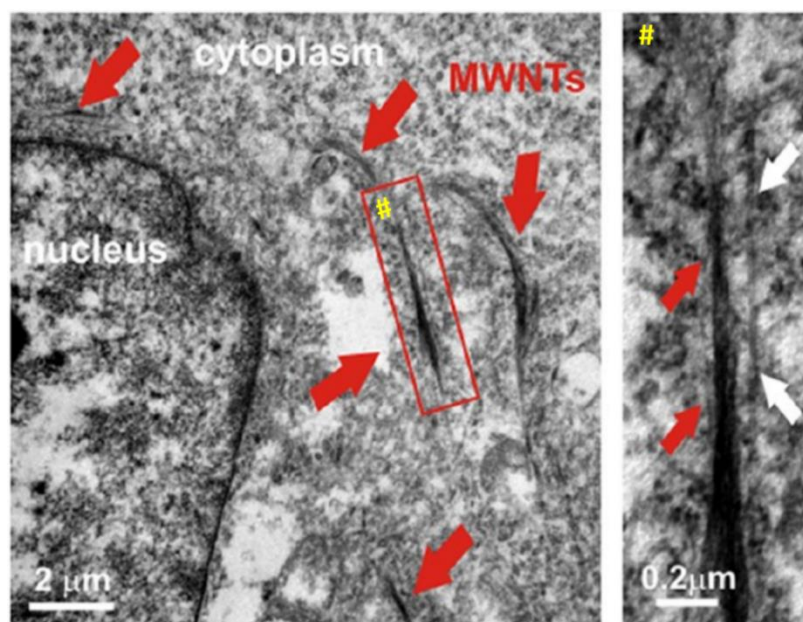


Figura 1.13. Imagen de microscopía de trasmisión electrónica (TEM) de una sección de una célula HeLa. Se observan racimos de NTCs dentro de las células (flechas rojas). La almohadilla es una ampliación de la imagen donde se observa un bundle de NTCs (flechas rojas) paralelos a microtúbulos (flechas blancas), lo que podría indicar una posible interacción lateral entre ambos. Adaptada de la ref. (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012).

Rodríguez-Fernández *et al.* demostraron en su trabajo que los NTCs podían actuar como inhibidores de la dinámica microtubular, imitando el efecto producido por los fármacos antimitóticos. Los microtúbulos normalmente irradian desde el centrosoma hasta la zona periférica de la célula, sin embargo se observó que cuando estas células eran expuestas a diferentes concentraciones de NTCs durante 70 h, esta disposición radial de

los microtúbulos desaparecía, observándose microtúbulos no conectados a los centrosomas, demostrándose así que los NTCs interfieren en las trayectorias de nucleación de microtúbulos (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012) (Figura 1.14).

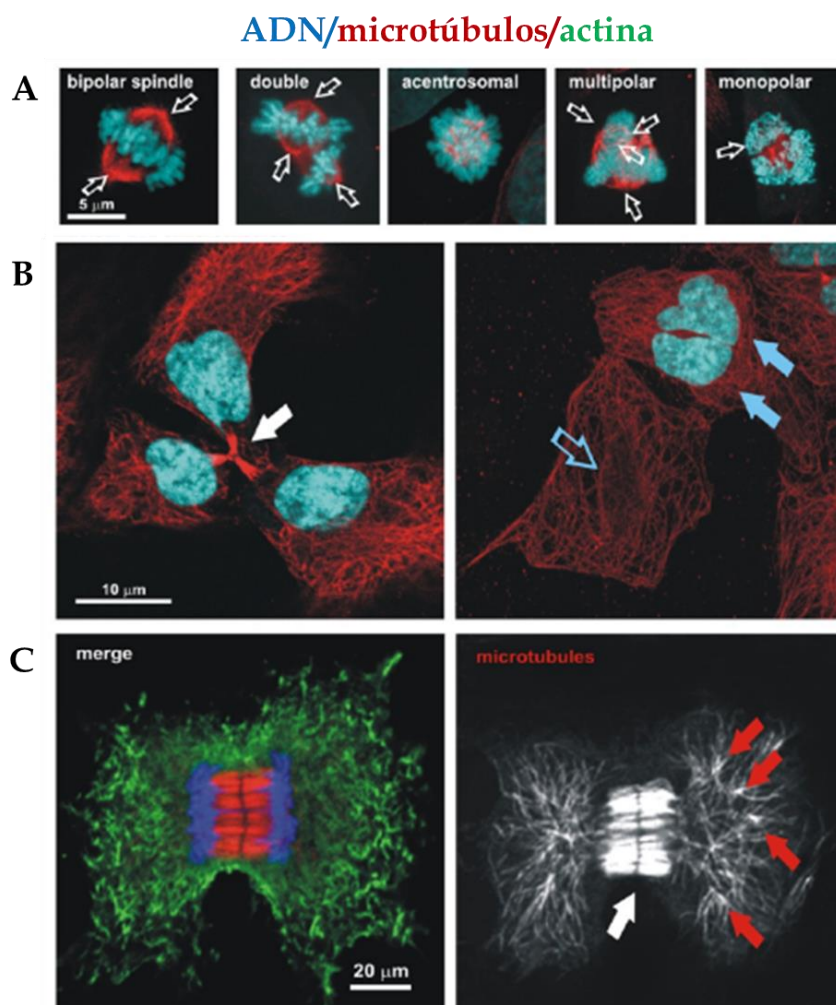


Figura 1.14. Imagen de microscopía confocal de husos mitóticos aberrantes en células tratadas con NTCs. Se observan aberraciones en la organización de los cromosomas (canal rojo) y en la distribución cromosómica (canal azul). Los centrosomas se indican mediante flechas blancas. **A)** Se presentan husos mitóticos aberrantes incluyendo husos dobles, microtúbulos acentrosomales desorganizados, husos multipolares y finalmente monoastrales (de izquierda a derecha). **B)** Telofases/citocinesis aberrantes en cultivos tratados con NTCs. Los defectos incluyen divisiones celulares tripolares (izquierda, flecha blanca) y asimétricas (derecha) donde los dos núcleos de las células hijas se han quedado en una única célula (flechas azules rellenas: célula con dos núcleos; flecha azul vacía: célula sin núcleo). **C)** Proyección de una imagen de microscopía confocal de una célula en anafase. Se observa una densidad anormalmente alta de microtúbulos en la zona media (canal rojo extraído en gris, flecha blanca) y microtúbulos con una disposición acentrosomal (flechas rojas). Adaptada de la ref. (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012).

El tratamiento con NTCs produce un amplio espectro de aberraciones que ocurren en todas las etapas mitóticas, observándose husos mitóticos y distribuciones

cromosómicas aberrantes. Así se pueden observar husos dobles, multipolares o monoastrales (Figura 1.14A) en las células HeLa tratadas con nanotubos. También se observaron telofases y anafases anormales, o telofases tripolares y divisiones celulares asimétricas (Figura 1.14B-C). Todos estos fallos mitóticos conducen a detenciones de la división celular y eventualmente a la muerte de la célula por apoptosis.

Los efectos provocados por los NTCs sobre las células cancerígenas son fenotípicamente idénticos a los producidos por los fármacos que interfieren en la dinámica de los microtúbulos descritos con anterioridad. Sin embargo, la interacción de los NTCs con los microtúbulos es diferente a la de los fármacos de unión a microtúbulos. Mientras los fármacos se unen a pequeñas zonas de contacto o bolsas estructurales dentro del polipéptido β -tubulina, los NTCs interaccionan a lo largo de todo el lateral de los protofilamentos de tubulina, existiendo una gran superficie de interacción entre el nanotubo y el polímero de tubulina, que es mucho más estable que la establecida entre la tubulina y cualquiera de estos fármacos (Figura 1.15).

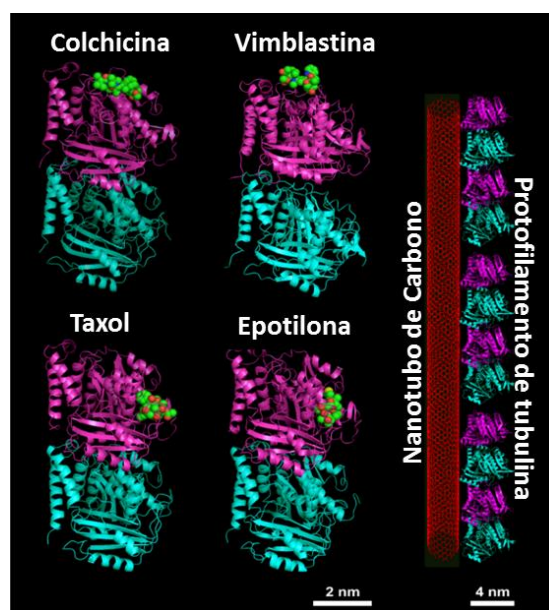


Figura 1.15. Comparación de la interacción de los fármacos tradicionales con la tubulina frente al modelo de interacción del NTC con el protofilamento de tubulina. Se muestra la α -tubulina en azul, la β -tubulina en rosa y los sitios de unión con diferentes fármacos en verde. Arriba: fármacos desestabilizadores de microtúbulos (Colchicina y Vinblastina). Abajo: fármacos estabilizadores de microtúbulos (Taxol y Eptilona). El modelo de interacción lateral entre el NTC (rojo) y un protofilamento de tubulina se muestra a la derecha (García-Hevia et al., 2014).

La interacción entre los NTCs y la tubulina que se presenta en el modelo de la Figura 1.15, presenta varias ventajas frente a los fármacos tradicionales. Por una parte, el

hecho de que la interacción tenga lugar a lo largo de todo el protofilamento hace difícil la aparición de resistencias por diferentes mutaciones o cambios post-traduccionales en el polipéptido de tubulina. Además, la interacción del nanotubo sigue permitiendo la unión de los fármacos tradicionales a la molécula de β -tubulina, por lo se podría llevar a cabo un posible efecto sinérgico a la acción de estos fármacos.

- **Los NTCs inhiben la progresión del tumor *in vivo*. El melanoma como modelo tumoral.**

A la hora de llevar a cabo estudios *in vivo*, se ha de tener en cuenta, que los tumores sólidos no son simplemente masas desorganizadas de células cancerígenas en división descontrolada. Por el contrario, son estructuras celulares complejas que se asemejan a un órgano, constituidas por múltiples tipos celulares y por componentes de la matriz extracelular, sometidos continuamente a procesos de remodelación del tejido (Egeblad *et al.*, 2010).

El modelo tumoral utilizado en esta tesis para llevar a cabo los estudios *in vivo* consiste en un tumor sólido de melanoma de ratón (ver capítulo III, sección 3.3.2). Este modelo fue desarrollado en el 2016 por García-Hevia *et al.* y es altamente representativo de la mayoría de tumores malignos, estando caracterizado por la presencia de acidosis local, edemas y abundantes células estromales que dan soporte y ayudan al crecimiento del tumor. Además, estos tumores presentan una alta tasa mitótica, focos necróticos intratumorales, pérdida de conexiones intercelulares (acantolisis), desarrollo de neovascularura, bordes tumorales expansivos e infiltración de tejidos circundantes (como grasa, músculos y nervios periféricos) y una respuesta inflamatoria significativa (García-Hevia *et al.*, 2016a) (Figura 1.16).

García-Hevia *et al.* observaron como una única inyección intratumoral de 2 μ g de NTCs producía un notable efecto antitumoral en los tumores sólidos de melanoma de ratón descritos anteriormente. Concretamente se observó una reducción de un 27 % del peso del tumor con respecto al control no tratado (García-Hevia *et al.*, 2016b).

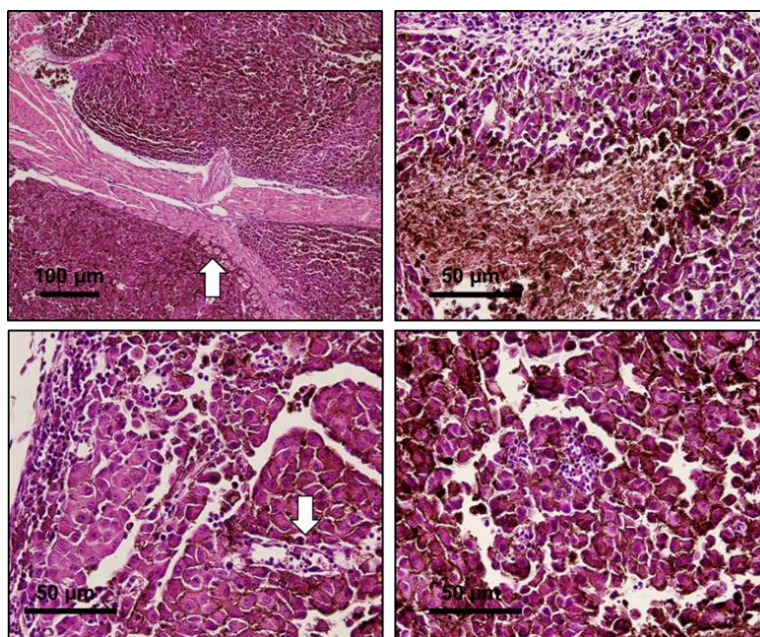


Figura 1.16. Exámenes histopatológicos de los tumores de melanoma. Arriba izquierda: Sección de hematoxilina-eosina del tumor que presentan características tumorales malignas típicas: como los bordes tumorales expansivos y neovascularización. Las células trasplantadas desarrollan la infiltración de masas de células tumorales con células epiteliales pigmentadas (flecha). Arriba derecha: se observa de cerca las masas de células pigmentadas dentro del órgano tumoral. Abajo izquierda: Detalle de la acantolisis (pérdida de conexiones intercelulares) que rodea los vasos sanguíneos pequeños cargados de eritrocitos (flecha). Abajo derecha: se observa acantolisis, además de una respuesta inflamatoria significativa, un alto índice mitótico y focos de necrosis intratumoral (García-Hevia et al., 2016a).

- **NTCs como sistema de liberación de fármacos.**

La otra aplicación biológica de los NTCs que se estudia en la presente tesis es su uso como sistema de administración de fármacos. Los sistemas de administración de fármacos ofrecen la posibilidad de liberar los fármacos *in situ*, en una concentración apropiada, maximizando los efectos producidos en las células tumorales y reduciendo al mismo tiempo la citotoxicidad de las células sanas (Peer et al., 2007).

Un sistema ideal de liberación de fármacos ha de tener como características principales i) que sea biocompatible, ii) que sus propiedades físico-químicas sean las adecuadas para poder encapsular o enlazar los fármacos o las moléculas de interés, iii) que sea fácilmente internalizado por las células, atravesando membranas biológicas sin producirle daños, iv) que permita hacer una liberación controlada del fármaco una vez dentro de la célula v) que tras ejercer su función, se degrada y elimine del organismo.

Los nanodispositivos actuales, ofrecen soluciones limitadas al problema de la administración citoplásmica de fármacos. Los mayores desafíos son i) el reconocimiento

celular específico, ii) la protección de la carga de las condiciones químicas lisosomales hostiles, iii) el escape endolisosómico no letal, iv) el transporte de diferentes terapias al citosol, y finalmente, v) la eliminación del nanotransportador para evitar la citotoxicidad a largo plazo.

Se puede encontrar en la literatura un gran número de estudios en los que se utilizan los NTCs como sistema de administración no sólo de fármacos antitumorales, sino también de biomoléculas como ADN, ARN, proteínas, etc. (Riggio *et al.*, 2009), (Madani *et al.*, 2011), Cs son unos buenos candidatos como sistemas de liberación de fármacos gracias a sus excelentes propiedades físico-químicas. Debido a **su fácil funcionalización** pueden enlazar en su superficie un amplio número de moléculas, bien sea mediante interacciones no covalentes (tipo Van der Waals, π - π o electrostáticas) o bien mediante enlaces covalentes como se explicó con anterioridad. Pero sin duda la propiedad que hace de este nanomaterial uno de los mejores candidatos como sistema de entrega de fármacos, es su facilidad para **atravesar barreras biológicas** y ser internalizados por todo tipo de células.

Con respecto a la **internalización de los NTCs** en las células, estudios experimentales y teóricos realizados durante los últimos diez años, han llevado a entender que los NTCs cortos y funcionalizados, interaccionan con las membranas biológicas, con otras barreras biológicas, y con muchos de los componentes que constituyen las células. Los NTCs permiten transportar fármacos a través de membranas biológicas al citoplasma sin causar daños a la célula. Esto es posible gracias a i) que presentan forma de fibra con un tamaño dentro de la escala nanométrica, ii) en el caso de que estén funcionalizados químicamente, presentan un carácter anfipático (hidrofóbico-hidrofílico), iii) sus dimensiones tanto longitudinales como laterales (Serpell *et al.*, 2016).

En muchos estudios se han observado como los NTCs son capaces de atravesar las membranas celulares directamente, eludiendo la ruta endocítica (Figura 1.17). La primera observación directa de NTCs atravesando membranas celulares se obtuvo en 2004, como parte de un estudio en el que se usaban nanotubos funcionalizados con grupos amonios como agentes de transfección para la administración de ADN (Figura 1.17a) (Pantarotto *et al.*, 2004), la liberación se corroboró mediante la expresión del ADN transportado. Al mismo tiempo, se realizó un estudio teórico en el que se encontró que los NTCs cortos y con grupos terminales hidrofílicos, interactúan con las membranas lipídicas formando

canales transmembrana (Figura 1.17b) (Lopez *et al.*, 2004). Poco después, se documentó la entrada controlada de NTCs en las células al utilizar nanotubos que poseían partículas de níquel ferromagnético en los extremos. Mediante la aplicación de un campo magnético los NTCs se podían mover rápidamente a través de las membranas celulares (Figura 1.17c, 1.17d) (Cai *et al.*, 2007).

A raíz de esos resultados, comenzó a pensarse en el uso de NTCs para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cerebro. La barrera hematoencefálica es uno de los mayores retos de la medicina hoy en día, de esta forma se pensó que las propiedades únicas de penetración de los NTCs podrían suponer una contribución significativa a este problema. En 2007 se observó como NTCs funcionalizados con diversos polímeros eran capaces de penetrar de forma directa dentro de microglía, células internas del sistema nervioso central (Figura 1.17e) (Kateb *et al.*, 2007). En 2011, se llevó a cabo una importante demostración *in vivo* del potencial de los nanotubos para atravesar membranas neuronales (Al-Jamal *et al.*, 2011). NTCs cargados positivamente se usaron para transportar ARN y administrarlo a células de cerebro de rata. El ARN utilizado interfiere con la expresión de la proteína caspasa-3. La entrega del ARN a través de las membranas neuronales se corroboró mediante la observación de reducciones en la producción de dicha proteína. Los NTCs dentro de las células neuronales se observaron mediante microscopía electrónica (Figura 1.17g).

También se ha estudiado la interacción de los NTCs con otras barreras biológicas. Ahora se puede entender la aparición de NTCs en la orina de animales tratados con este nanomaterial. La mayoría de los nanomateriales no se excretan de esta forma debido a que requiere pasar a través de poros de 30 nm de ancho. Estudios de microscopía revelaron como NTCs con diámetros de entre 20-30 nm eran capaces de reorientarse *in vivo*, perpendicularmente a la membrana, pasando a través de sus poros (Figura 1.17f) (Lacerda *et al.*, 2008).

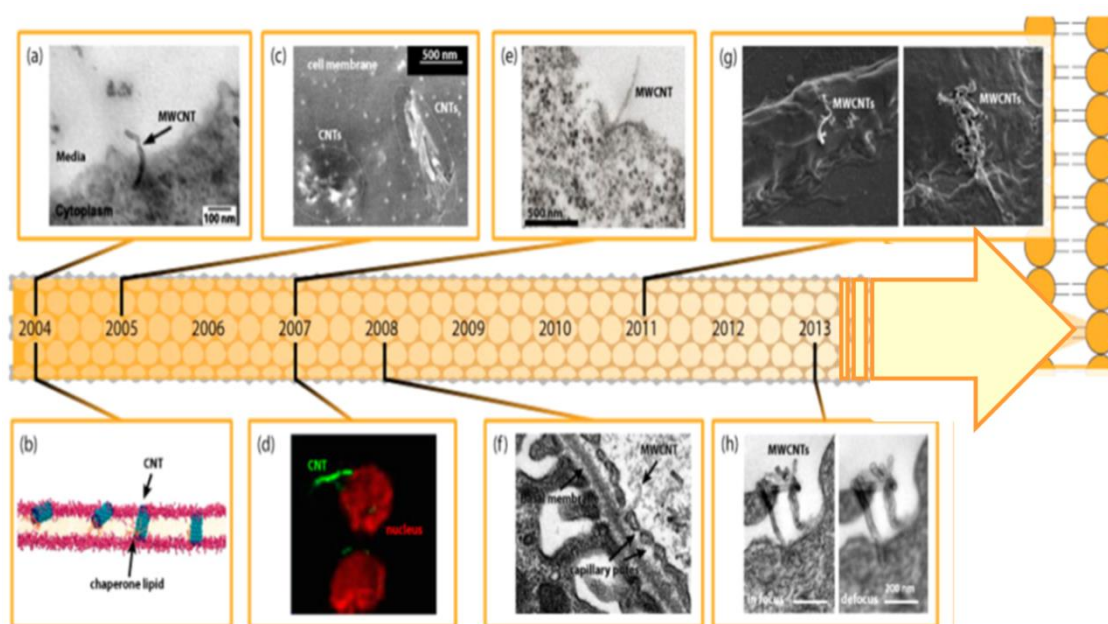


Figura 1.17. Penetración directa de membranas biológicas por NTCs. a) Imagen TEM de NTCs entrando en células HeLa. b) Simulación mediante dinámica molecular de NTCs cortos formando un canal en la membrana. c) Imagen SEM de nanotubos con partículas magnéticas dentro de células MCF-7. d) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de NTCs con partículas magnéticas entrando en linfocitos B. e) Imagen TEM de NTCs penetrando en microglía. f) Imagen TEM de NTCs individuales pasando perpendicularmente a través de filtros biológicos en el riñón g) Imágenes SEM de NTCs cruzando la membrana neuronal. h) Imágenes TEM de NTCs cruzando membranas de células A549 (Serpell et al., 2016).

Por otro lado, también se han observado mecanismos de **entrada de los NTCs en las células mediados por endocitosis**. Shi *et al.* muestran en su trabajo NTCs entrando dentro de células de hígado de ratón mediante endocitosis. En la Figura 1.18 se observan imágenes de SEM de alta resolución en las que se pueden apreciar invaginaciones en la membrana plasmática, que daban como resultado la formación de las vesículas propias de la endocitosis, que finalmente acabarían desprendiéndose al citosol con los nanotubos en su interior (Shi *et al.*, 2011).

La entrada de los NTCs a través de la ruta endocítica es de gran relevancia a la hora de intentar direccionar el nanotransportador de forma específica hasta las células tumorales. El nanotubo puede ser funcionalizado con determinadas moléculas o anticuerpos que fueran reconocidos únicamente por receptores de las membranas de las células dianas y entrar en ellas mediante endocitosis. Esta entrada endocítica de los nanotubos en las células será estudiada más ampliamente en el capítulo IV de la presente tesis.

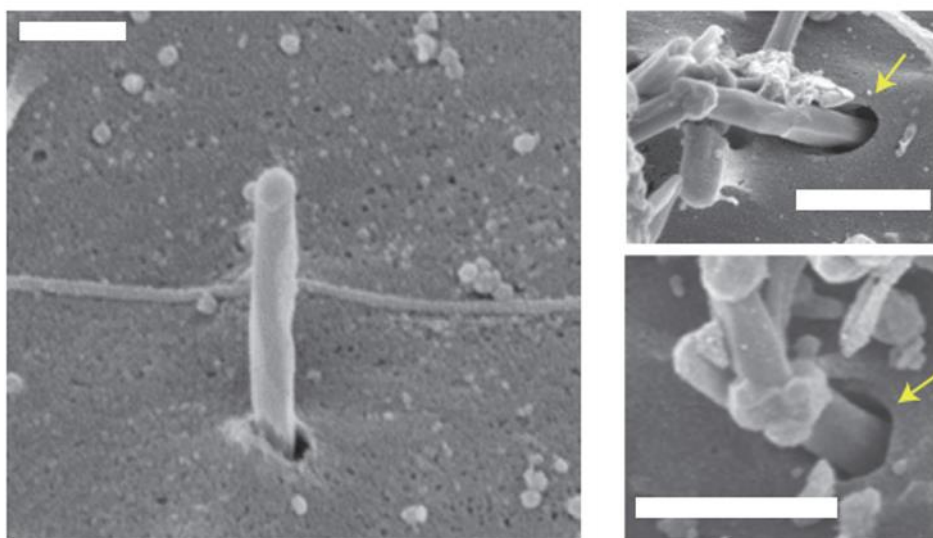


Figura 1.18. Entrada de NTCs en células de hígado de ratón vía endocitosis. Izquierda: NTCs en proceso de entrada a la célula, penetrando perpendicularmente a la membrana plasmática. Derecha: Las flechas muestran las invaginaciones en la membrana características de la endocitosis. Barra de escala, 300 nm. (Shi et al., 2011).

En resumen, se puede decir que la capacidad de los NTCs para atravesar el umbral entre una célula viva y su entorno circundante es único: ningún otro método parece mostrar la misma eficacia, lo que abre las puertas a muchas posibles aplicaciones terapéuticas.

Se puede concluir diciendo que las excelentes propiedades de superficie de los NTCs pueden ser una doble herramienta en la lucha contra el cáncer. Por un lado, permiten transportar en su superficie determinados fármacos anticancerígenos o biomoléculas y gracias a su facilidad para penetrar a través de membranas biológicas, **liberarlos *in situ***, dentro de las células malignas. Por otro lado, tienen **propiedades antitumorales intrínsecas**, provocando por sí mismos efectos anti-proliferativos y citotóxicos en neoplasias altamente agresivas y heterogéneas como melanomas malignos, muy difíciles de tratar con quimioterapias convencionales.

- **Inconvenientes de los NTCs.**

Desafortunadamente, a pesar de los interesantes resultados obtenidos con los NTCs como posibles agentes antineoplásicos y transportadores de fármacos, hay un largo camino antes de que se puedan aplicar en la clínica. Sus posibles efectos a largo plazo, tales como tasas de eliminación, acumulación en tejidos, daño tisular, etc., son cuestiones

claves que se necesitan estudiar y mejorar. Entre los efectos secundarios no deseados cabe destacar que los NTCs desencadenan reacciones inflamatorias, citotóxicas, roturas de ADN, mal segregación cromosómica, etc. (Madani *et al.*, 2013), (Rittinghausen *et al.*, 2014), (Kostarelos, 2008), (Lee *et al.*, 2012), (Hamilton *et al.*, 2013). Por lo tanto, uno de los posibles inconvenientes para la aplicación de los NTCs en Nanomedicina es la imposibilidad de eliminar completamente este nanomaterial después de la terapia, pudiendo tener un efecto acumulativo.

El descubrimiento de la **biodegradación** de los NTCs *in vitro* por células fagocíticas del sistema retículo-endotelial, ha abierto nuevas oportunidades. Estas células pueden degradar todo tipo de biomoléculas capturadas por las rutas de entrada endocíticas o fagocíticas. Sus lisosomas, que tienen un pH ácido de 4.5, contienen una gran variedad de enzimas (hidrolasas ácidas y peroxidasas) que son capaces de digerir gradualmente los NTCs (Kagan *et al.*, 2010), (Nunes *et al.*, 2012), (Andón *et al.*, 2013), (Farrera *et al.*, 2014), (Seo *et al.*, 2015), (Elgrabli *et al.*, 2015a). El estudio de la biodegradación de los NTCs es uno de los objetivos en el que se centra esta tesis.

El segundo inconveniente a mencionar de los NTCs, es con respecto a su uso como sistema de liberación de fármacos. Una de las características que debe tener un sistema ideal de liberación como se mencionó anteriormente, es que permita la liberación controlada de la terapia. En el caso de que la droga esté unida de forma no covalente a la pared del nanotubo es muy posible que se intercambie con el medio fisiológico, produciéndose la liberación antes de que se produzca la entrada en la célula.

Por otro lado, a la hora de funcionalizar los NTCs con los fármacos o biomoléculas de interés, se ha de tener en cuenta la estructura y estabilidad de dichas moléculas en determinadas condiciones. En el caso de que las interacciones entre los fármacos y la superficie del nanotubo sean no-covalentes, lo ideal sería que la droga o molécula de interés tuviera una estructura plana con anillos aromáticos para que se dieran interacciones π - π con los anillos del nanotubo, o bien si la molécula presentasen cargas positivas se podrían crear grupos carboxílicos con cargas negativas en la superficie del nanotubo sometándolo a procesos oxidativos con ácidos, así sería posible establecer interacciones electrostáticas entre el nanotubo y el fármaco. Sin embargo, en el caso de que no se dieran estas condiciones la funcionalización no-covalente se haría más compleja,

y probablemente no existiría la suficiente afinidad entre fármaco y nanotransportador como para que permanezcan unidos.

Por otro lado, la funcionalización covalente no siempre es posible. Determinados fármacos son muy sensibles a las condiciones de reacción en las que se produce la unión y se degradan al enlazarlos al nanotubo perdiendo su funcionalidad. Además, no todos los fármacos tienen los grupos funcionales idóneos para que las reacciones con la superficie del nanotubo tengan lugar.

Estos inconvenientes hacen necesaria la búsqueda de otro sistema más completo que permita transportar una mayor variedad de compuestos, y que asegure una mayor protección del fármaco. Así, la última parte de esta tesis doctoral consiste en la síntesis y evaluación de un sistema de entrega de fármacos multiestructurado, que aproveche las ventajosas propiedades de los NTCs, y que a la vez permita solventar todas las desventajas mencionadas anteriormente.

1.2.1.3. Partículas de sílice mesoporosa.

Las partículas de sílice mesoporosa (SiO_2 MP) tienen una serie de características que las hacen una buena elección como sistema de liberación de fármacos antitumorales. A continuación se estudian brevemente cada una de ellas (Iturrioz-Rodríguez *et al.*):

i) Propiedades físico-químicas.

Presentan una estructura interna mesoporosa bien ordenada con un gran volumen de poro ($0.2\text{-}1.0\text{ cm}^3/\text{g}$) y una elevada superficie que puede oscilar entre $700\text{-}1000\text{ m}^2/\text{g}$. La síntesis de dichas partículas puede modificarse para conseguir tamaños en un rango entre $40\text{-}600\text{ nm}$ (Qianjun *et al.*, 2009). Estas características abren la posibilidad a transportar diferentes drogas anticancerígenas tales como docetaxel (Khosravian *et al.*, 2016), paclitaxel (Meng *et al.*, 2015) o doxorubicina (Rosenholm *et al.*, 2011), entre muchas otras.

ii) Liberación controlada del fármaco.

Las partículas de SiO_2 MP cumplen bien esta función debido a su estructura porosa. Una de las principales ventajas de estas partículas es la posibilidad de diseñar sistemas donde los fármacos entren en los poros mediante mecanismos de difusión y una vez

dentro producir el bloqueo de los poros mediante el recubrimiento con diversos polímeros para evitar su salida prematura. Posteriormente, se podrían emplear diferentes estímulos para llevar a cabo la liberación controlada del fármaco: **estímulos internos** como el pH, potencial redox, enzimas, etc.; o **estímulos externos**, como campos magnéticos, luz o un aumento de temperatura. A continuación, se pasará a estudiar con más detalles estos estímulos:

- **Estimulación interna. Sistemas sensibles al pH:** como ya se ha indicado, unas de las características generales del cáncer es la presencia de un entorno ácido debido al “efecto Warburg”. Una estrategia efectiva para controlar la liberación de fármacos es el uso de polímeros u otras estructuras tales como liposomas, que recubran la partícula de SiO₂ e impidan que se de la liberación a pH fisiológico, pero que sin embargo se degrade a pH ácidos, liberando el fármaco en el entorno tumoral.
- **Estimulación interna. Sistemas sensibles a las enzimas:** las células tumorales sobre-expresan determinadas enzimas en comparación con las células sanas (Cheng *et al.*, 2015). Este hecho permite el diseño de sistemas de liberación sensibles a la acción de dichas enzimas. Por ejemplo, la metaloproteínasa es una enzima que genera proteólisis y que se encuentra sobre-expresada en muchos tumores, estando asociada con la metástasis. En un estudio realizado por Liu *et al.* se utilizó un sistema de administración de un fármaco antitumoral basado en partículas de SiO₂ MP recubiertas por albúmina de suero bovino, la cual permite el sellado de los poros, pero a su vez es sensible a la acción de la proteasa. Los experimentos *in vivo* mostraron que este sistema permitía liberar la terapia *in situ*, observándose efectos antineoplásicos y disminuyendo los efectos secundarios propios de la administración de la droga libre (Liu *et al.*, 2015).
- **Estimulación interna. Sistemas sensibles al potencial redox:** el glutatión es un tripéptido no proteico constituido por glutamato, cisteína y glicina. Actúa como agente reductor, ayudando a proteger a las células de las especies reactivas de oxígenos como los radicales libres y los peróxidos y, además, mantiene las enzimas en estado activo. En las células cancerosas, la concentración de glutatión es tres veces mayor que en las células normales, por lo que puede ser una buena herramienta a la hora de idear sistemas de liberación de medicamentos (Saito *et al.*, 2003). El glutatión tiene mucha afinidad por la reducción de los enlaces disulfuro, pasando a convertirse tras la reacción redox en su

forma oxidada, disulfuro de glutatión. Teniendo en cuenta esto, se pueden idear sistemas de liberación de fármacos susceptibles a la acción del glutatión o de otros agentes reductores. Por ejemplo, Gong *et al.* sintetizaron partículas de SiO₂ MP funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) unido mediante un enlace disulfuro que servía para taponar los poros, evitando la liberación precoz del medicamento (Gong *et al.*, 2015). Los resultados mostraron un aumento de la liberación del fármaco cuando la concentración de glutatión era mayor.

- **Estimulación externa. Campos magnéticos:** el uso de campos magnéticos como estímulo externo supone una doble herramienta a la hora de llevar a cabo el transporte y la liberación de fármacos. Al aplicar un campo magnético alterno, por un lado es posible dirigir las partículas magnéticas hacia el entorno tumoral de forma controlada y, por otro lado, aumentar su temperatura, desencadenando la liberación del fármaco encapsulado o la muerte de la célula tumoral por hipertermia (Mura *et al.*, 2013). Las nanopartículas magnéticas más utilizadas son las de óxido de hierro superparamagnético, debido a su capacidad para convertir energía magnética en calor (Laurent *et al.*, 2011), (Torres-Lugo & Rinaldi, 2013). Las partículas de SiO₂ MP pueden recubrirse con este tipo de nanopartículas de tal forma que taponen sus poros y solamente dejen salir la terapia una vez aplicado un campo magnético externo (Baeza *et al.*, 2012).

- **Estimulación externa. Luz:** la luz es un estímulo externo rápido, no invasivo, limpio y eficiente que puede controlar la liberación de fármacos con una alta resolución espacial y temporal (Ferris *et al.*, 2009), (Wu & Butt, 2016). Aunque la mayoría de las fotorreacciones usadas en liberación de drogas son inducidas mediante luz ultravioleta (UV) (Ferris *et al.*, 2009), (Inoue *et al.*, 2007), (Wang *et al.*, 2014), la radiación ideal para que se de la penetración en los tejidos es aquella comprendida entre 800 y 1100 nm, lo que se corresponde con una de las ventanas biológicas (Mekaru *et al.*, 2015). El mecanismo de actuación de estos sistemas se basa en la fotosensibilidad del agente que recubre la sílice y tapona los poros impidiendo que salga el fármaco, el cual permanece estable hasta que se aplica la luz y se produce un cambio conformacional que activa la liberación.

iii) **Internalización celular. Ruta endo-lisosomal.**

Estas partículas entran en la célula mediante endocitosis mediada por receptores y posteriormente pueden ser expulsadas de las células mediante exocitosis (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017), (Oh & Park, 2014), (Hu *et al.*, 2011). Pero una vez dentro de las células, antes de ser exocitadas, es necesario que el nanotransportador sea liberado al citoplasma, para evitar así la degradación del fármaco producida por las condiciones reductoras/ácidas lisosomales. Para que esto suceda se pueden llevar a cabo varias estrategias:

- **Efecto esponja de protones:** determinados polímeros como la polietilenamina (PEI) o poliamidoamina (PAMAM) pueden ir unidos a la superficie de las partículas transportadoras y provocar dicho efecto. Los grupos aminos de estas moléculas son capaces de capturar protones y acumularlos en los lisosomas, de modo que el potencial de la membrana aumenta rompiéndose el equilibrio. Como este equilibrio se mantiene por la difusión de los iones cloruro, estos iones comienzan a entrar en los lisosomas causando un aumento de la presión osmótica. Para regular la presión osmótica, se produce la entrada de agua al interior de los lisosomas, lo que produce su hinchazón y posterior explosión al romperse la bicapa lipídica, liberando su contenido en el interior del citoplasma (Freeman *et al.*, 2013).
- **Desestabilización de la membrana endosomal:** otro mecanismo para desencadenar el escape endo-lisosomal de las partículas es el uso de determinadas estructuras como lípidos de fusión, polímeros catiónicos, péptidos (Ma, 2014) o **nanotubos de carbono** (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017). Estas estructuras pueden fusionarse con la membrana endo-lisosomal o interaccionar con las paredes de las vesículas creando poros de membrana, fundamentales para la liberación de las partículas al citoplasma.

iv) **Biocompatibilidad.**

Una de las características más importantes de las partículas de SiO₂ MP es su alta biocompatibilidad. Diferentes estudios en los que estas partículas fueron administradas a varios tipos celulares y a ratones demostraron que no producen citotoxicidad (Agostini *et al.*, 2012), (Chen *et al.*, 2013), (Slowing *et al.*, 2008), (Lu *et al.*, 2010). Además, hay trabajos que muestran que son degradables tanto en agua como en medios salinos (Vallet-Regí *et*

al., 2018). La morfología, el tamaño y la funcionalización (Chen *et al.*, 2012), (Paris *et al.*, 2015), (Cauda *et al.*, 2010a) de las partículas son factores a tener en cuenta cuando se habla de degradación.

Se puede concluir que las partículas de SiO₂ MP tienen excelentes propiedades que las hacen un buen candidato como sistemas de liberación de fármacos. A modo de resumen, estas características son: i) poros de tamaño óptimo para poder almacenar fármacos en su interior, ii) se puede controlar la liberación de la droga utilizando determinados polímeros o biomoléculas para recubrirlas, taponando los poros y utilizando mecanismos para activar la liberación una vez estén dentro de las células dianas, iii) pueden escapar de la ruta endo-lisosomal, liberando el fármaco en el citoplasma celular y evitando que éste sea degradado por las condiciones ácido/reductoras presentes en los lisosomas y, finalmente, iv) son biocompatibles y biodegradables en medios biológicos.

1.2.1.4. Sistema multiestructurado de liberación de multit terapias.

Una vez estudiados ambos tipos de nanomateriales resulta interesante la elaboración de un sistema multiestructurado que aproveche las propiedades de ambos, disminuyendo al mismo tiempo sus desventajas. Por ejemplo, es interesante el recubrimiento de la superficie de las partículas de SiO₂ MP con NTCs, mejorando la internalización de las mismas en las células y ayudándolas a salir de los endo-lisosomas, liberando la terapia en el citoplasma celular. Por otro lado, gracias a las propiedades de funcionalización de los NTCs es posible enlazar determinadas moléculas a su superficie, estas moléculas pueden ser fármacos antitumorales que supongan una terapia alternativa a la terapia encapsulada en los poros de la sílice, o por ejemplo, podrían ser moléculas conductoras que guíen a través del torrente sanguíneo estos transportadores hasta las células dianas. De esta forma se podría crear una revolucionaria herramienta para la terapia contra el cáncer. En el estudio del diseño de dispensadores de SiO₂ MP recubierta por NTCs se centrará el último objetivo de la presente tesis doctoral.

II. Objetivos.

“Ten en cuenta que el gran amor y los grandes logros requieren grandes riesgos”.

Dalai Lama.

2.1. Objetivo general.

El objetivo general que persigue esta tesis doctoral, es llevar a cabo el diseño y la evaluación *in vitro* e *in vivo* de nanodispensadores de quimioterapias, basados en nanotubos de carbono (concretamente MWCNTs) modificados químicamente para mejorar su biocompatibilidad.

2.2. Objetivos específicos.

Los objetivos concretos que se proponen para alcanzar el objetivo final de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Diseño y caracterización de un nanodispensador del fármaco antitumoral 5-FU basado en MWCNTs.
2. Estudio de la liberación del 5-FU transportado por los MWCNTs *in vitro*, en células humanas de cáncer de cuello de útero y en células de melanoma maligno de ratón, e *in vivo*, en modelos tumorales sólidos de melanomas de ratón.
3. Estudio del efecto sinérgico antitumoral producido entre el 5-FU liberado y los MWCNTs, *in vitro* e *in vivo*.
4. Modificación química de la superficie de los MWCNTs para hacerlos más biocompatibles.
5. Estudio de la degradación de los MWCNTs *in vitro*, en macrófagos de ratón, e *in vivo*, en tumores sólidos de melanoma en ratones.
6. Estudio de la conservación de las propiedades intrínsecas antitumorales de los MWCNTs biodegradables.
7. Diseño de un nanodispensador de multi-terapias contra el cáncer, basado en un núcleo de sílice mesoporosa (SiO₂ MP) recubierto con MWCNTs biodegradables.

III. Materiales y Métodos.

“La raza humana necesita un desafío intelectual. Debe ser aburrido ser Dios y no tener nada que descubrir”.

Stephen William Hawking.

3.1. Nanomateriales.

3.1.1. Nanotubos de Carbono.

Se utilizaron nanotubos de carbono prístinos de pared múltiple (p-MWCNTs) de origen comercial de dos casas comerciales diferentes, Nanocyl (Ref. NC3100™) y Sigma Aldrich (Ref. 698849). En la Tabla 3.1 se presentan las principales características físicas de cada uno de ellos.

Tabla 3.1. Principales características físicas de los p-MWCNTs utilizados.

	Nanocyl Ref. NC3100™	Sigma Aldrich Ref. 698849
Pureza	> 95 %	> 98 %
Diámetro externo medio (nm)	9.5	8.7-10
Longitud media (μm)	1.5	10

3.1.1.1. Oxidación de Nanotubos de carbono multipared prístinos.

Los nanotubos de carbono prístinos (p-MWCNTs) se dispersaron mediante sonicación con punta (sonicador SONICS Vibra-cell VCX130) durante 5 min (frecuencia de 20 kHz, 130 W) en una mezcla sulfonítrica H₂SO₄ (98 %)/HNO₃ (65 %) en relación de volúmenes (v/v = 3/1), (2.5 mg de p-MWCNTs por cada mililitro de mezcla sulfonítrica). A continuación, se puso la mezcla a 37 °C en agitación magnética continua durante diferentes tiempos (2, 6 y 9 h) para conseguir distintos grados de oxidación. Por último, la disolución ácida sobrante se eliminó mediante filtración utilizando un tamaño de poro de 0.45 μm (Ref. MPV045047N). Los MWCNTs se lavaron repetidas veces con agua hasta pH neutro. El producto final obtenido se denota como o-MWCNTs.

3.1.1.2. Funcionalización no covalente.

i) Funcionalización con suero fetal bovino:

Los MWCNTs se recubrieron con una mezcla proteica procedente de suero fetal bovino (FBS) (Figura 3.1). Para ello se resuspendieron en medio de cultivo con 30 % de FBS (Life Technologies, Ref. 10270-106) mediante ciclos repetidos de vortex seguidos de leve sonicación con punta, usando el sonicador anteriormente mencionado (3 min,

frecuencia de 20 kHz, 130 W), manteniendo la muestra en hielo (Fanarraga *et al.*, 2014). A continuación, para comprobar la estabilidad de la suspensión se centrifugó a 12000 g y se descartó el precipitado. La concentración del sobrenadante se determinó mediante la medida de la transmitancia en el colorímetro Biochrom Libra S2. Para determinar la concentración se utilizó una recta de calibrado obtenida con disoluciones de concentraciones conocidas de MWCNTs, a una longitud de onda de 550 nm de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

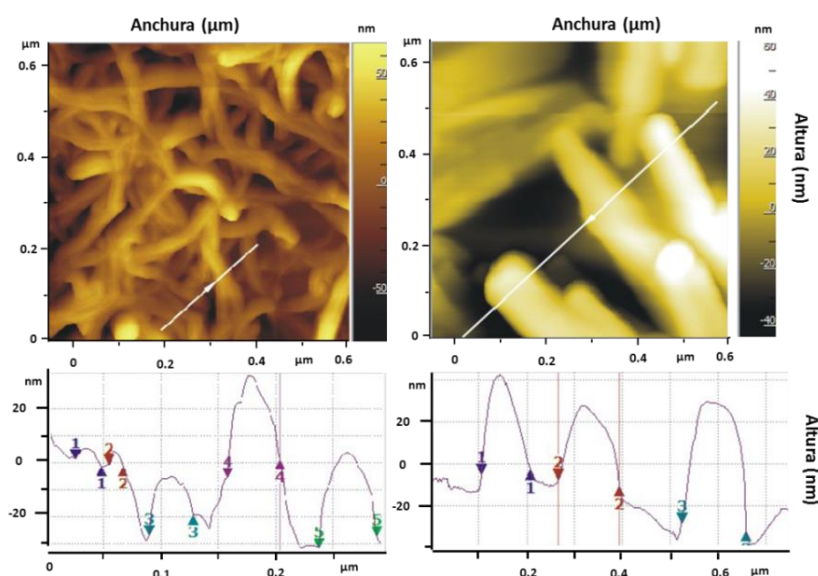


Figura 3.1. Imagen de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). MWCNTs prístinos (izquierda) y MWCNTs funcionalizados con FBS (derecha). Se observa un ensanchamiento del diámetro de los MWCNTs debido a la funcionalización con proteínas séricas. Adaptada de la ref. (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012).

ii) Funcionalización con 5-FU:

Los p-MWCNTs (Sigma Aldrich) se resuspendieron en agua destilada mediante sonicación en punta (2 min, frecuencia de 20 kHz, 130 W). Una vez dispersos se añadió 5-FU en una concentración de 8.3 mg/mL (Disolución stock de 50 mg/mL. Ref. 603544.3, Accord). La mezcla se sonicó en baño durante 15 min. Posteriormente se dejó en agitación 2 h a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con agua destilada tres veces en repetidos ciclos de centrifugación (12000 g, 5 min)/redispersión.

3.1.1.3. Funcionalización covalente de o-MWCNTs con 5(6)-carboxitetrametilrodamina N-succinimidil ester (5-TAMRA):

La reacción consta de tres pasos. En un primer paso se neutralizó la cistamina que se empleó como molécula de unión entre el o-MWCNT y el colorante (5-TAMRA). Para ello, se mezclaron 53 mg de cistamina•2HCl (96 %, Fluka) con 68 µL de trietilamina BioUltra (99 %, Sigma Aldrich) usando como disolvente 1.6 mL de N,N-dimetilformamida (DMF, 99.8 %, Fluka). La mezcla se dejó en agitación durante 30 min.

En la segunda etapa se añadieron 37 mg de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 99 %, Sigma Aldrich) y 62.5 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 99 %, Sigma Aldrich) a 1 mL de la disolución de la cistamina neutralizada en el paso anterior, a esta mezcla se añadieron 3 mg de o-MWCNTs dispersados en 10 mL de DMF. Después de 24 h en agitación, los reactivos en exceso se eliminaron mediante tres ciclos de centrifugación (3300 g, 20 min)/redispersión en EtOH. El producto obtenido en esta segunda etapa es el siguiente: MWCNT-C(O)-NH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NH₂ (**P2**).

En la tercera y última etapa se llevó a cabo la unión del colorante a **P2**. Para ello se mezclaron 5.3 µL de una disolución de 5-TAMRA (disolución stock: 50 mg/mL, Sigma Aldrich), con el sedimento sólido **P2** obtenido en la etapa anterior, en un volumen final de 5 mL de EtOH. Tras 24 h en agitación la mezcla se centrifugó y el producto final se lavó con EtOH mediante repetidos ciclos de centrifugación (3300 g, 20 min)/redispersión. El lavado final se realizó con agua destilada. El producto final fue el siguiente: MWCNT-C(O)-NH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NH-TAMRA (**P3**).

Los MWCNTs fueron comprados de Nanocyl y oxidados en nuestro laboratorio mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1.1. La reacción (Figura 3.2) se diseñó y realizó en colaboración con el Dr. Miguel Correa Duarte de la Universidad de Vigo. Un esquema del mecanismo de reacción para las tres etapas descritas se resume en la Figura 3.2.

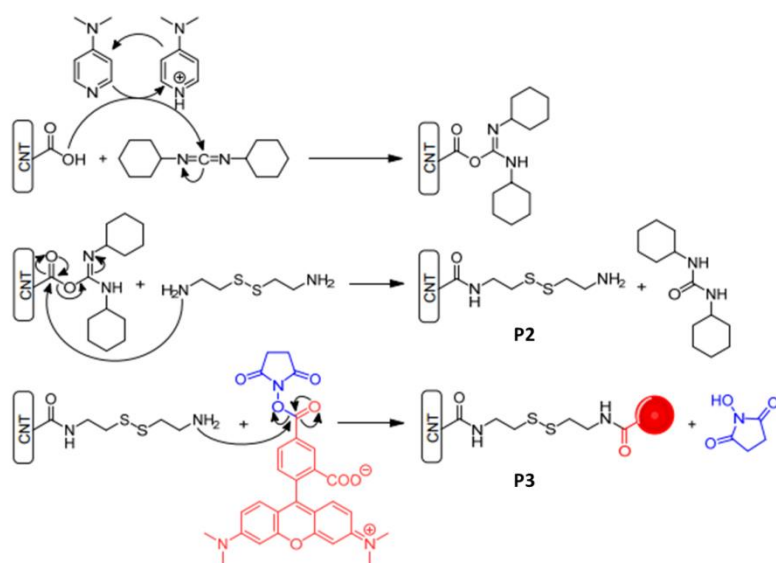


Figura 3.2. Esquema del mecanismo de reacción de la funcionalización de nanotubos de carbono con 5-TAMRA (rojo).

3.1.1.4. Liberación de 5-TAMRA *in vitro*.

Para llevar a cabo el estudio de liberación *in vitro* del 5-TAMRA enlazado a la superficie de los MWCNTs (P3) según la reacción indicada en la Figura 3.2, se utilizó el agente reductor 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Ref. M-6250). Se añadieron 500 μL de 2-mercaptoetanol a 1 mg de P2 y se observó la liberación del colorante mediante espectroscopía de fluorescencia (ver sección 3.1.3.3).

3.1.2. Partículas de Sílice Mesoporosa (SiO_2 MP).

3.1.2.1. Procedencia de los reactivos utilizados.

Isotiocianato de rodamina B (RBITC, 70 % *labelling efficiency*, Sigma Aldrich), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTS, 98 %, Sigma Aldrich, Ref. A3648), cloruro de poli(dialildimetilamonio) (PDDA, MW<100 000 Da, Sigma Aldrich, Ref. 522376), poli(sodio 4 estirenosulfonato), (PSS, MW=70000 Da, Sigma Aldrich, Ref. 243051), hidróxido sódico (NaOH, ≥ 97 %, Sigma Aldrich), tetraetilortosilicato (TEOS, 98 %, Sigma Aldrich, Ref. 131903), EtOH, ácido bromopirúvico (Sigma Aldrich, Ref. 16490), 2-deoxy-D-glucosa (Sigma Aldrich, Ref. D8375), ácido dicloroacético (Sigma Aldrich, Ref. D54702) y ácido oxámico (Sigma Aldrich, Ref. O3750). Hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30 % NH_3 ,

Fluka). Cloruro sódico (NaCl , $\geq 99\%$, Merk). Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $99+\%$, ACROS, Ref. 227165000).

Todos los procesos descritos en este apartado se realizaron durante mi estancia en la Universidad de Vigo – CIMBIO, bajo la dirección del Dr. Miguel Correa Duarte y con ayuda de los miembros del equipo (Team Nano Tech).

3.1.2.2. Síntesis de SiO_2 MP.

Se llevó a cabo la síntesis de partículas de sílice mesoporosa (SiO_2 MP) de tamaño controlado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Qianjun *et al.*, 2009).

i) Partículas de SiO_2 de 500 nm de diámetro:

En un matraz de tres bocas se añadieron 0.857 g de K_2HPO_4 , 0.145 g de NaOH y 100 mL de agua destilada. Se puso la mezcla en agitación controlando la temperatura de forma que alcanzara los $95\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuviera constante durante toda la reacción. Se añadieron 0.455 g de CTAB disueltos en 10 mL de agua destilada. Una vez la temperatura estuvo completamente estabilizada, se añadieron 15 mL de glicerol. A continuación, se añadió un total de 4.875 mL de TEOS, repartidos en 12 adiciones (una adición de 406 μL cada 30 min). Tras la última adición, la reacción se mantuvo durante 2 h más en agitación. Una vez que la mezcla se enfrió, se centrifugó a 3300 g durante 15 min. Por último, se lavó el producto blanquecino obtenido, la primera vez con una mezcla $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) y cuatro veces más con EtOH mediante repetidos ciclos de centrifugación (3300 g, 10 min)/redispersión.

ii) Partículas de SiO_2 de 160 nm de diámetro:

En este caso se utilizó el mismo procedimiento anterior, pero ahora el volumen total de TEOS añadido fue de 2.23 mL y se añadió todo en una única adición, dejando posteriormente la mezcla en agitación durante 8 h. El tamaño final de las partículas de SiO_2 se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (ver sección 3.1.3.5).

3.1.2.3. Proceso de calcinado.

Una vez sintetizadas las partículas, se eliminó el surfactante (CTAB), mediante calcinación a $600\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 h.

En el caso en que las partículas no se pudieron calcinar a altas temperaturas, se utilizó un procedimiento más suave basado en el tratamiento con disolventes orgánicos: la muestra se concentró en un pequeño volumen de EtOH. A continuación, se añadieron 20 mL de una mezcla de tetrahidrofurano (THF)/H₂O en proporciones de volumen 3:1 (v/v). Se sonicó la mezcla durante 15 min y, posteriormente se centrifugó a 3300 g durante 20 min, lavando el sedimento sólido con EtOH. En el siguiente paso, se volvió a centrifugar y se redispersó la muestra en un volumen pequeño de EtOH. Se añadieron de nuevo 20 mL de THF/H₂O, esta vez en proporciones 1:3 (v/v) y se sonicó durante 15 min, repitiendo a continuación el proceso de centrifugación y lavado con EtOH.

3.1.2.4. Sellado y recubrimiento de las partículas de SiO₂ MP con o-MWNTs.

El sellado de las partículas de SiO₂ MP se llevó a cabo mediante la técnica “*layer-by-layer*” (Decher *et al.*, 1992), (Costa & Mano, 2013). En primer lugar, las partículas se funcionalizaron con tres capas de polielectrolitos de la manera siguiente: a una disolución de 25 mL de un polielectrolito con carga positiva (PDDA) de 2 mg/mL en NaCl 0.5 M, se añaden 12.5 mg de partículas de SiO₂ MP de 500 nm de diámetro, o bien 5 mg de partículas de SiO₂ MP de 160 nm de diámetro. La mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de PDDA se eliminó centrifugando/redispersando 3 veces en agua (3300 g, 10 min), una sola vez en el caso de las partículas de 200 nm. A continuación se funcionalizaron con una segunda capa del polielectrolito negativo PSS. El sólido se dispersó en 25 mL de una disolución de PSS (2 mg/mL, 0.5 M NaCl) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. El exceso de PSS se eliminó siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior. Por último, se recubrió con una tercera capa de PDDA siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores (Figura 3.3).

Las partículas de sílice funcionalizada y con una carga superficial positiva se recubrieron con o-MWCNTs (Figura 3.3). Para ello se mezclaron 12.5 mg de SiO₂ (5 mg en el caso de SiO₂ de 200 nm de diámetro), en 40 mL de agua, 2 mL de NaCl 0.5 M y 6 mL de una suspensión de o-MWCNTs de concentración 75 µg/mL. La mezcla se dejó en agitación durante 12 h. Al día siguiente se eliminaron los reactivos en exceso mediante centrifugación (3300 g, 20 min) y lavados con agua.

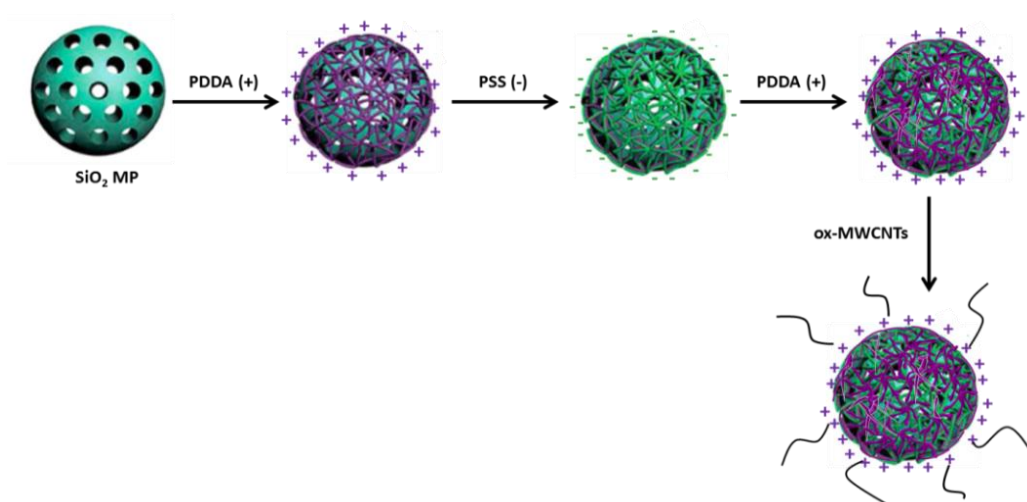


Figura 3.3. Esquema del mecanismo de sellado de las partículas de SiO₂ MP por el método “layer-by-layer” y posterior recubrimiento con o-MWCNTs.

Por otro lado, para el estudio futuro de la liberación de los compuestos encapsulados en los poros de las partículas de sílice, estas se sellaron con un polímero más biodegradable que el PDDA, la poly-L-lisina (PLL), y esta vez el número de capas pasó de tres a una (Figura 3.4). El proceso que se siguió fue el mismo que para la funcionalización de PDDA, pero en este caso la concentración de PLL fue de 0.25 mg/mL.

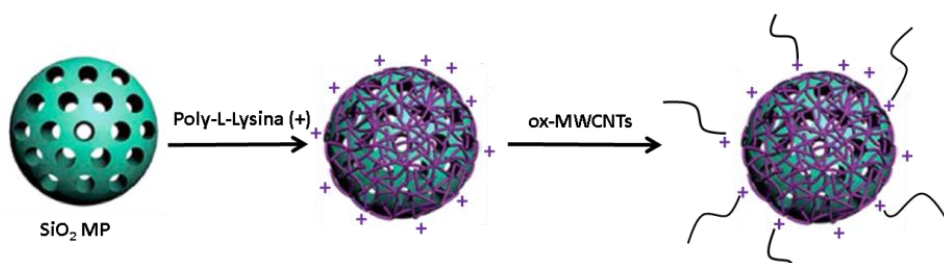


Figura 3.4. Esquema del mecanismo de sellado de las partículas de SiO₂ MP con poly-L-lisina y posterior recubrimiento con o-MWCNTs.

3.1.3. Caracterización de los nanomateriales.

3.1.3.1. Espectroscopía Raman.

La espectroscopía vibracional Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de un material o compuesto permitiendo así su identificación. El análisis se basa en el examen de la luz dispersada por la muestra al incidir sobre ella un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son

característicos de la muestra analizada, e independientes de la frecuencia de la luz incidente (González & Marquina, 2011), (González & Manjon, 2015).

A lo largo de esta tesis, se utilizó la espectroscopía Raman para estudiar la funcionalización, oxidación y degradación de los MWCNTs. Los MWCNTs prístinos tienen un espectro Raman característico, en el que se puede distinguir una banda a 1330 cm^{-1} (banda D o de Desorden), una banda a 1586 cm^{-1} (banda G o Tangencial), la cual representa las vibraciones tangenciales de los átomos de carbono a lo largo de la capa, una banda a 1614 cm^{-1} (banda D'), que normalmente se observa como un hombro de la banda G y, por último, una banda en torno a 2650 cm^{-1} denominada G' correspondiente a un sobretono de la banda D (Del Corro *et al.*, 2008), (Jorge *et al.*, 2008), (Tilmaiciu *et al.*, 2009) (Figura 3.5).

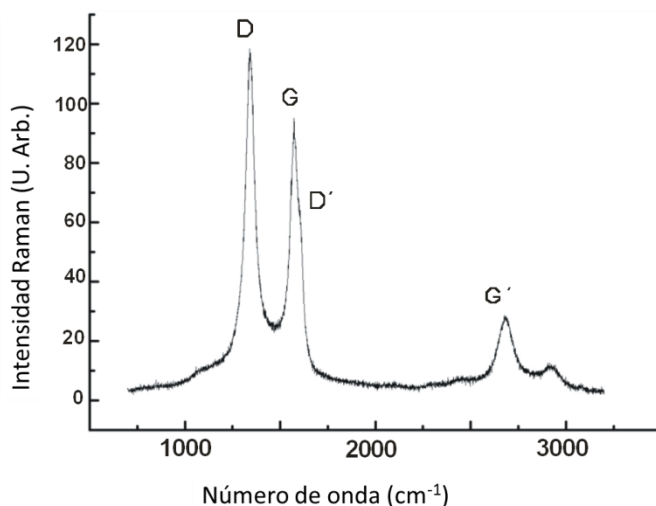


Figura 3.5. Espectro Raman de MWCNTs Prístinos. Se observan las bandas características. Banda D a 1330 cm^{-1} , banda G a 1586 cm^{-1} , banda D' a 1614 cm^{-1} y banda G' a 2650 cm^{-1} .

La banda D está relacionada con la presencia de átomos de carbono que presentan hibridación sp^3 en la superficie del nanotubo, de esta forma, es indicadora de la presencia de defectos en las paredes de los mismos. Por tanto, los cambios en el cociente entre intensidades integradas o áreas (A) de las bandas D y G, A_D/A_G , dan información semicuantitativa sobre el grado de alteración de la superficie del nanotubo. A medida que aumente el cociente A_D/A_G querrá decir que el número de defectos aumenta, la cantidad de carbono sp^3 es mayor y, por tanto, el grado de funcionalización es también mayor. Esto ha permitido estudiar, entre otras cosas, el grado de degradación de este material en el interior de células y tejidos.

Se empleó un espectrómetro Raman T64000 (Horiba), junto con un láser Ar⁺-Kr⁺ y una CCD refrigerada por nitrógeno líquido (Jobin-Yvon Symphony) acoplado a un microscopio confocal. El software LabSpec permitió el control completo del equipo y la adquisición de los datos. Las mediciones espectroscópicas las llevó a cabo el Dr. Jesús González, investigador del grupo de Nanomedicina y del grupo de Altas Presiones y Espectroscopía, del Departamento de Ciencias de la Tierra y Física de la Materia Condensada de la Universidad de Cantabria.

3.1.3.2. Espectroscopía Infrarroja.

La espectroscopía Infrarroja (IR) es otra espectroscopía vibracional que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. Proporciona información similar y complementaria a la espectroscopía Raman. Se llevó a cabo en un espectrofotómetro Jasco LE4200. Los espectros se adquirieron por acumulación de 264 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹ en el rango de 4000-400 cm⁻¹ (IR medio). Para la preparación de la muestra, se mezcló la muestra sólida con bromuro potásico (KBr). Se preparó una pastilla homogénea mediante una prensa hidráulica y se secó en horno antes de la medición. En el caso del análisis semicuantitativo desarrollado en el capítulo IV, sección 4.2.1.2, la pastilla se preparó con masas conocidas de MWCNTs y KBr, de esta forma las concentraciones obtenidas fueron de 2400 µg, 2400 µg y 1576 µg por gramo de KBr para p-MWCNTs, 2h o-MWCNTs y 9h o-MWCNTs, y un espesor de pastilla de 350 µm, 280 µm y 280 µm, respectivamente. Los espectros de absorción resultantes se normalizaron en relación a las concentraciones y espesores para poder comparar la intensidad de los picos directamente.

Los espectros de IR se obtuvieron con la ayuda de la Dra. Carmen Pesquera González del Departamento de Química e Ingeniería de Procesos y Recursos y miembro de nuestro grupo de investigación.

3.1.3.3. Espectroscopía de Fluorescencia.

En la espectroscopía de fluorescencia, se excita la muestra desde su estado electrónico fundamental a uno de sus estados excitados, generalmente mediante luz ultravioleta (UV). Las colisiones entre moléculas provoca que se pierda energía vibracional hasta que se alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico

excitado. La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Como el electrón puede caer a cualquiera de los diferentes niveles vibracionales del estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, frecuencias. Así pues, si se miden las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante se obtiene el **espectro de emisión**. Para obtener un **espectro de excitación**, se detecta la luz emitida a una longitud de onda determinada, y la muestra se va excitando a diferentes longitudes de ondas mediante un monocromador, recogiendo los cambios de intensidad de la emisión para cada longitud de onda de excitación.

El equipo utilizado en esta tesis fue el espectrofluorímetro Edinburgh Instruments (FLSP920) equipado con dos monocromadores (para la excitación y la emisión). Consta de detectores para la región visible, extendido visible e InGaAs y una lámpara continua de Xe de 450 W. Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos con la ayuda del Dr. Rafael Valiente Barroso del departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria.

3.1.3.4. Análisis Termogravimétrico y Espectrometría de Masas.

La técnica de análisis termogravimétrico (TGA) mide la cantidad y rapidez del cambio en el peso de una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo, en una atmósfera controlada. De esta forma, permite determinar el grado de funcionalización de los nanomateriales de forma cuantitativa. Por otro lado, la espectrometría de masas es una técnica cualitativa basada en la obtención de iones a partir de las moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenido estos iones, se separan en función de su relación masa-carga (m/z), y finalmente son detectados por medio de un dispositivo adecuado.

El equipo de análisis térmico utilizado fue el TG-DSC marca SETARAM Modelo Setsys Evolution 1750, cuyo rango de temperatura abarca desde la ambiente hasta los 1500 °C. Este equipo se encuentra acoplado al espectrómetro de masa THERMOSTAR modelo GSD 301 T, el cual permite determinar la naturaleza del material descompuesto. El software que utiliza el equipo es QUADSTARTM 422. Se colocó la muestra en una microbalanza, que se introduce en un horno de alta precisión. Los gases que emanan tras someter la muestra a la rampa de temperatura se siguen mediante espectrometría de masas. Para ello existe una interfase capilar calefactada a 150 °C que une ambos equipos.

La presión normal de trabajo varía entre $1 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Las mediciones se llevaron a cabo tanto en atmósfera de nitrógeno seco como en aire seco, a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y un flujo de gas de $20\text{ cm}^3/\text{min}$. El detector utilizado es tipo Faraday. Las muestras se analizaron con la ayuda del Dr. Fernando González Martínez del Departamento de Química e Ingeniería de Procesos y Recursos, miembro del grupo de investigación de Nanomedicina.

Durante mi estancia en el laboratorio del Pr. Maurizio Prato en Trieste, el equipo utilizado fue el analizador Termogravimétrico Q500 (TA INSTRUMENTS).

3.1.3.5. Microscopía Electrónica de Transmisión.

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones acelerado impacta sobre una muestra ultra-fina, interactuando con ella y generando una serie de señales directamente relacionadas con su estructura atómica. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente. La información que se obtiene es una sombra de la muestra con distintas intensidades de grises que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

Los equipos utilizados para el estudio y caracterización de los MWCNTs fueron un JEOL JEM 1011 equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución que se encuentra disponible en los servicios tecnológicos del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Y el microscopio electrónico JEOL JEM 2100 con una cámara Gatan Orius SC 1000B. Las imágenes de microscopía electrónica tomadas con este segundo equipo fueron a cargo de la Dra. Lidia Rodríguez, técnico responsable del Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión (SERMET) de la Universidad de Cantabria. Se utilizaron rejillas de cobre con recubrimiento de carbono (malla 400) (EMResolutions.com C400Cu).

Por otro lado, para la caracterización de las partículas de SiO_2 sintetizadas durante mi estancia en Vigo se empleó el microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM 1010 utilizando un voltaje de 100 kV.

3.2. Cultivos celulares.

3.2.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Las líneas celulares con las que se trabajó a lo largo de la tesis aparecen recogidas en la Tabla 3.2. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37 °C, con unos niveles de CO₂ del 5 % y una humedad relativa del 95 %. La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

Tabla 3.2. Líneas Celulares

Línea Celular	Origen	Medio de cultivo	Identificación celular de ATCC
HeLa	Células de cáncer de cuello de útero humano	DMEM 10 % FBS	ATCC® CCL-2™
B16F10	Células de melanoma maligno de piel de ratón	IMDM 10 % FBS	ATCC® HTB-22™
J774	Macrófagos de sarcoma de retículo de ratón	IMDM 10 % FBS	ATCC® TIB-67™

Las líneas celulares se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Ref. 41090-028) o Medio Iscoves de Dulbecco Modificado (IMDM, Life Technologies, Ref. 21980-032), (tabla 3.2), suplementados con 10 % de suero fetal bovino (FBS) inactivado a 50 °C durante 30 min y filtrado, junto con antibiótico gentamicina 10 µg/mL (LONZA, Ref. BE02-012E). En el caso de las células HeLa, se levantaron usando tripsina 10X (0.5 % peso) (LONZA, Ref. BE02-007E) diluida con HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, PAN BIOTECH, Ref. P04-34500).

3.2.2. Extracción de MWCNTs del interior de las células.

Para llevar a cabo el estudio de la degradación intracelular de los MWCNTs se utilizaron dos técnicas, la espectroscopía Raman y la Microscopía electrónica de transmisión (TEM), (ver capítulo IV, sección 4.2.2). Para analizar la degradación mediante TEM, fue necesario en primer lugar, extraer los MWCNTs del interior de las células. Para ello, se expusieron macrófagos de ratón de la línea J774 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs resuspendidos en IMDM con 10 % de FBS, durante 96 h. Pasado este tiempo, se centrifugó a 260 g durante 5 min, para llegar a cabo la separación del pellet celular por un lado, y el medio de cultivo con los MWCNTs que no se habían interiorizado en las células por otro. Tanto el pellet como el medio de cultivo se procesaron en paralelo de la misma forma para poder comparar ambas muestras directamente. Las muestras se trataron sucesivamente con PBS-T (tampón fosfato salino, Lonza, Ref. 17-516F al 0.1 % de Tritón X-100) al 1 %, HCl al 35 % y por último acetona.

Este procedimiento se llevó a cabo tanto para células incubadas con p-MWCNTs como con o-MWCNTs, siguiendo los mismos pasos en ambos casos, y con cantidades idénticas de células (aproximadamente 9×10^6 células).

3.2.3. Contaje y viabilidad celular.

Habitualmente se necesitó determinar tanto la densidad de las células en suspensión como la viabilidad de las mismas. Para determinar la densidad celular se han empleado diferentes técnicas, desde la simple cámara de contaje celular, en nuestro caso una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico (Nikon), hasta equipos automáticos de contaje celular, como el disponible en nuestro laboratorio de Nanomedicina (TC20TM *Automated Cell Counter* de BIO-RAD).

Para el análisis de la viabilidad celular se utilizó el método de la **Tinción por Exclusión**, que se basa en el uso de un colorante, azul de tripán (del inglés *Trypan Blue*, Sigma-Aldrich, Ref. T8154). Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta son muy selectivos a los compuestos que pueden pasar a través de ella, de esta forma, debido a su tamaño y su carga eléctrica este colorante solamente puede teñir las células necróticas, cuyas membranas se encuentran permeabilizadas. Para su evaluación, se diluyó el azul de tripán en medio de cultivo 1:1 (v/v) y se contaron las células en cámara

de Neubauer bajo el microscopio óptico (Nikon), y mediante el contador automático TC20TM *Automated Cell Counter* de BIO-RAD.

3.2.4. Citometría de flujo.

Con esta técnica se obtiene información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de una muestra representativa de la población (10.000 eventos de media). La suspensión de células se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico. Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro.

La utilización de este sistema permite el recuento y la clasificación de células según sus características morfológicas o presencia de biomarcadores fluorescentes. El análisis de la fluorescencia permite estudiar de forma cuantitativa y cualitativa el contenido total de ADN por célula. Esto permite la determinación simultánea de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular.

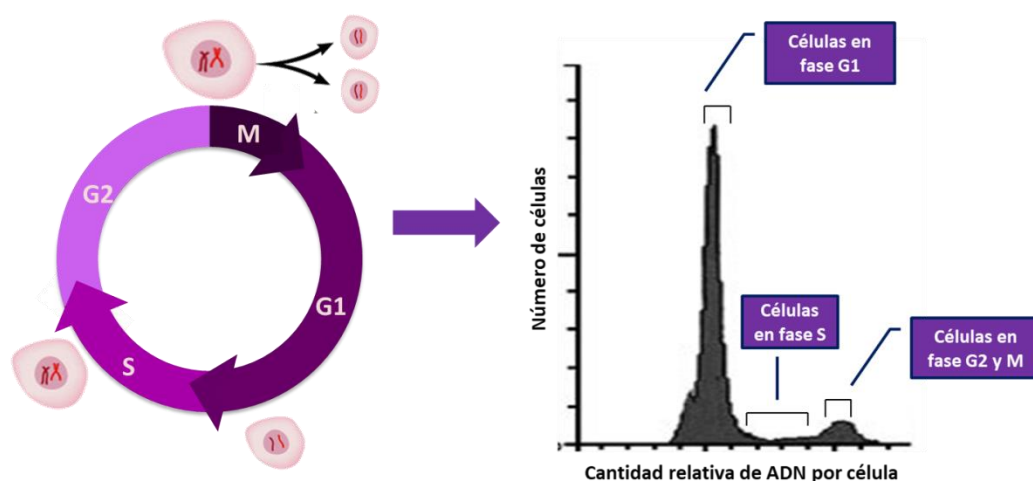


Figura 3.6. Representación de las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Para su estudio se centrifugaron las células a 260 g durante 5-10 min y se lavó el pellet con 2-5 mL de HBSS. Se contaron las células con cámara de Neubauer, con el fin de obtener el mismo número en todas las muestras (aproximadamente 10^6 células). El pellet celular resultante tras la centrifugación se fijó con 1 mL de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Ref. 15710) al 4 % (15-20 min de incubación). Posteriormente se

centrifugó de nuevo y el pellet se mezcló con 250 μ L de PBS-T + Hoechst 1:100 (Hoeschst 33258, Sigma-Aldrich, Ref. B1155) y se incubó 12-14 h a 4 °C. Por último, las muestras se conservaron en PBS a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Se trabajó en el citómetro de flujo FACSCanto™ (Becton-Dickinson, USA) del departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria. Y con el citómetro CytoFLEX A00-1-1102 (Bectam Coulter), de la Unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular del IDIVAL.

3.2.5. Microscopía de contraste de fases.

El microscopio de contraste de fases acoplado a una cámara permite obtener imágenes de células vivas sin ninguna preparación previa. Para las fotos de rutina el microscopio utilizado fue un Nikon eclipse TS100F invertido con una cámara digital Progress CT5 (Jenoptik).

3.2.6. Inmunofluorescencia.

Se cultivaron las células sobre cubreobjetos de borosilicato redondos (Thermo, Ref. 0385) 24 h antes de realizar la inmunofluorescencia. Se lavaron con PBS 1X y se fijaron utilizando paraformaldehído al 4 % en PBS 1X (15-20 min de incubación). Tras la fijación, las células se permeabilizaron incubándolas con metanol durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se lavó tres veces con PBS-T (Tritón X-100) al 0.1 %. Finalmente, las células se incubaron con los anticuerpos apropiados. Para su almacenamiento, los cubreobjetos fijados se dejaron en una solución de PBS + 0.1 % de azida sódica (NaN_3) a 4 °C.

El anticuerpo primario comercial utilizado fue el anti α -tubulina B512 monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich, Ref. T5168). La muestra se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con dicho anticuerpo y, posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 min cada uno con PBS-T 0.1 %. El anticuerpo secundario utilizado fue IgG1 anti-ratón de cabra conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Ref. A11029). Para visualizar los núcleos se utilizó Hoechst 1:4000 (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich, Ref. B1155). Para la visualización de la actina se utilizó Isotiocianato de Tetrametilrodamina B. (Sigma Aldrich, Ref. P1951). Las muestras se montaron en medio Inmu-Mount (Thermo, Ref. 9990402) sobre portamuestras (CellPath, Ref. MAE-1000-03P).

3.2.7. Microscopía de epifluorescencia convencional.

En el microscopio de epifluorescencia convencional la muestra es iluminada con una longitud de onda determinada. La imagen observada es el resultado de la radiación emitida por las moléculas que han sido previamente excitadas. Para detectar sólo la emisión deseada, se colocan filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se pueden observar muestras que previamente se han teñido con un fluoróforo o a las cuales se ha realizado una preparación inmunofluorescente. El microscopio de fluorescencia que se utilizó fue un Zeiss Axiovert 200 M.

3.2.8. Microscopía láser-confocal.

Se trata de una técnica de observación microscópica que permite obtener imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal que la microscopía óptica tradicional, y sobre todo, permite obtener secciones ópticas de la muestra, lo que hace posible su estudio tridimensional.

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco; para ello, consta de dos diafragmas (*pinholes*), uno entre la fuente de luz y el objetivo, y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos deben estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad, dependiendo de los aumentos de los objetivos. Se han empleado objetivos 10X, 20X, 60X y 100X.

El microscopio utilizado fue un Nikon A1R equipado con varias líneas de láseres (longitudes de onda: 405, 488, 514, 561, 633 nm) y con dos sistemas de detección: por filtros en cuatro canales y espectral de 32 canales con tres redes de difracción diferentes.

3.3. Modelo animal.

3.3.1. Modelo murino *in vivo*.

La experimentación *in vivo* se realizó en ratones neonatos albinos CD-1, los cuales se mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. El cuidado y manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo las normas de experimentación con animales dictadas por la directiva europea (86/609/CEE), de acuerdo con la legislación española vigente (Real Decreto 1201/2005) y siguiendo procedimientos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo el amparo jurídico y los permisos concedidos a los proyectos MINECO-ISCI (PI16/000496, AES 2016) y MINECO-ISCI (PI13/01074, AES 2013).

3.3.2. Generación de tumores por alotrasplantes en ratones.

Los experimentos se llevaron a cabo en camadas de ratones CD-1 postnatales de 2 días. La técnica consiste en un xenotrasplante de las células tumorales melanocíticas B16F10 en ratones neonatos (Figura 3.7). El tumor generado es fácilmente identificable por su pigmentación negra. Dado que el número de crías por camada influye de manera significativa en las condiciones de velocidad del desarrollo de éstas y, por lo tanto, en el tamaño final del tumor, este artefacto, inherente al sistema *in vivo*, se redujo haciendo de cada camada un experimento independiente. Todas las crías de la misma camada se inyectaron simultáneamente siguiendo procedimientos idénticos. Se trasplantaron aproximadamente 4×10^5 células de melanoma mediante inyección en la zona subcutánea intra-escapular de cada ratón neonato. Se esperaron 7 días para el crecimiento del tumor, y posteriormente se les inyectó el tratamiento objeto de estudio, teniendo los controles dentro de la misma camada. Este procedimiento reduce al máximo el ruido inherente del sistema de cribado *in vivo*, reduciendo por tanto la variabilidad estadística no específica (García-Hevia *et al.*, 2016a).

Este sistema de trasplante presenta numerosas ventajas, entre las que cabe mencionar (García-Hevia *et al.*, 2016a):

- La presencia de abundantes factores de crecimiento y las condiciones hormonales de estos ratones neonatos garantiza que sea un sistema rápido, obteniéndose tumores de un tamaño aceptable entre los 6-10 días post-inyección. Las masas tumorales ya se pueden observar entre los 2-4 días post-trasplante a través de la piel en animales vivos (Figura 3.8).
- Es un sistema fácil y de bajo coste (se utilizan ratones albinos normales).
- Es fácilmente accesible, por estar en la piel y poseer pigmentación negra lo cual lo hace fácilmente identificable.
- Es reproducible como se puede observar en la Figura 3.8.
- El sistema inmunológico poco desarrollado de los ratones neonatos, garantiza que no haya rechazo y exista un desarrollo completo del órgano tumoral.

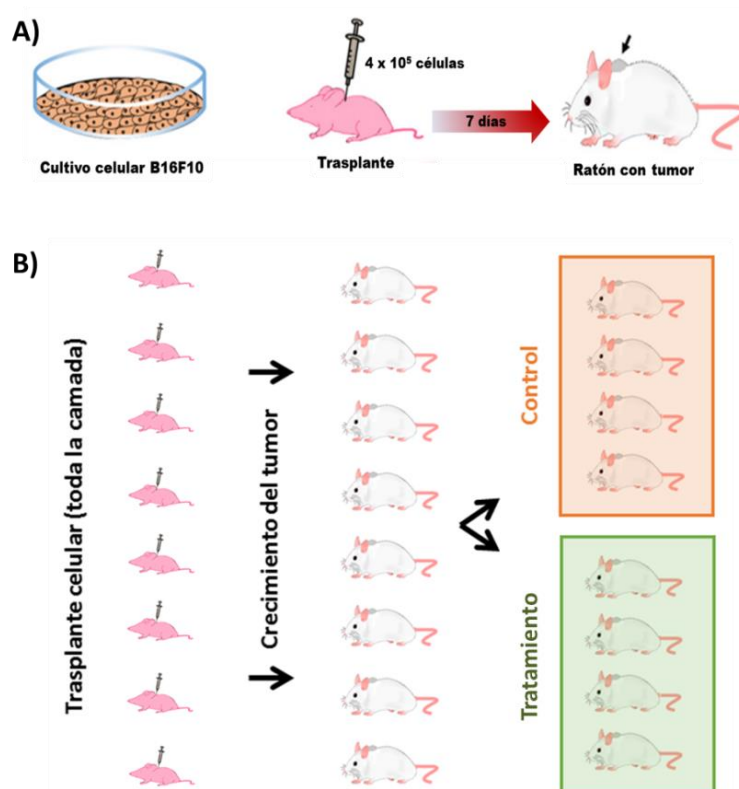


Figura 3.7. Esquema representativo de la generación de tumores melanocíticos en ratones CD-1 postnatales de dos días. A) La línea celular B16F10 se crece y amplifica *in vitro*. Después tiene lugar el trasplante interescapular subcutáneo de 4×10^5 células en el ratón hospedador. Pasados 7 días el tumor progresa y se puede identificar gracias a su pigmentación oscura (flecha negra). B) Diseño experimental del procedimiento seguido para los experimentos *in vivo*. Una camada completa se usa para cada experimento. Todas crías de la camada son trasplantados siguiendo procedimientos idénticos. Una vez crecido los tumores, la camada se divide en partes iguales entre ratones controles y tratamientos (García-Hevia et al., 2016a).



Figura 3.8. Imágenes de los tumores en ratones. Arriba a la izquierda: ratones con 4 días post-trasplante, las flechas apuntan al punto de inyección. A la derecha: ratones con tumores pigmentados visibles. Abajo a la izquierda: evaluación macroscópica de los tumores generados, mostrando la ubicación y el tamaño de varios tumores en ratones de la misma camada de 12 días de edad (5 días post-trasplante). Abajo centro: imagen de un tumor de melanoma in situ. A la derecha un ratón postnatal 15 con un tumor de melanoma sólido (flecha) (García-Hevia et al., 2016a).

3.4. Análisis estadístico.

Para los estudios estadísticos en los que se analizaron diferencias entre dos poblaciones, se utilizó el test de la t de Student. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p \geq 0,05$, significativas cuando $p < 0,05$ (*), muy significativas si $p < 0,01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0,001$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático SigmaPlot 8.0.

Para el análisis de la distribución de tamaños de las partículas de SiO_2 , se utilizó el Programa Image Tool, mediante el cual se midió el diámetro de más de 200 partículas para cada muestra, obteniendo el valor medio y su desviación estándar. El histograma de la distribución se realizó con el programa Origin 8.5.

IV. Resultados y Discusión.

“Cuando pones la proa visionaria hacia una estrella y tiendes el ala hacia tal excelsitud inasible, afanoso de perfección y rebelde a la mediocridad, llevas en ti el resorte misterioso de un Ideal”.

José Ingenieros.

4.1. Nanotubos de carbono como nanotransportadores del 5-FU. Estudio del efecto sinérgico entre ambos.

Uno de los principales objetivos en la lucha contra el cáncer, es la administración de dosis de fármacos de forma específica en las células tumorales, maximizando la eficacia del tratamiento y al mismo tiempo minimizando los efectos secundarios. Aunque la mayoría de los fármacos antitumorales existentes son muy potentes, su eficacia está limitada debido a su toxicidad a nivel sistémico, y a la capacidad de las células cancerígenas para adquirir resistencia contra ellos a través de diversos mecanismos (Luqmani, 2005). El descubrimiento de nanomateriales como los NTCs, capaces de atravesar la membrana plasmática y promover la captación celular de las moléculas que transportan, ha ofrecido nuevas oportunidades en diversas aplicaciones biológicas, entre ellas la búsqueda de tratamientos alternativos contra el cáncer (Ali-Boucetta *et al.*, 2008).

Todo el trabajo realizado a lo largo de esta tesis se ha desarrollado utilizando MWCNTs, por ello, a continuación se pasará a hablar concretamente de este tipo de nanotubo.

Como se mencionó en la introducción, los MWCNTs presentan propiedades biomiméticas con los microtúbulos (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012), (Pampaloni & Florin, 2008), los cuales son la diana de muchos fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer. Las similitudes entre estos filamentos proteicos y los MWCNTs hacen que se produzca interacciones entre ellos, lo que desemboca en cambios críticos en los biomecanismos celulares, resultando en un efecto anti-proliferativo (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012), anti-migratorio (García-Hevia *et al.*, 2015a), (Dong *et al.*, 2015) y citotóxico (García-Hevia *et al.*, 2015b) en células tumorales *in vitro*, así como un significativo efecto anti-tumoral *in vivo* (García-Hevia *et al.*, 2016b). Estos resultados sugieren que los MWCNTs podrían tener una aplicación como adyuvantes en el desarrollo de nuevas terapias, potenciando el efecto antitumoral de los fármacos tradicionales contra el cáncer.

Por otro lado, llevando a cabo una funcionalización adecuada, los MWCNTs pueden usarse como nanotransportadores de fármacos, genes, proteínas u otras biomoléculas utilizadas en el tratamiento del cáncer (Son *et al.*, 2016). Como se expuso en el capítulo I, los MWCNTs tienen forma acicular (largos y delgados), lo que les proporciona una gran

habilidad para cruzar barreras biológicas con independencia del tipo de célula del que se trate (Serpell *et al.*, 2016). Además, tienen una elevada área superficial, lo que les suministra múltiples sitios de unión con determinados fármacos o moléculas de interés, cabiendo además la posibilidad de crear grupos funcionales en su superficie (carboxilos, carbonilos, hidroxilos, etc.) haciéndolos más hidrofílicos (Liu *et al.*, 2013) y creando nuevas posibilidades de interacción con moléculas polares.

Muchos estudios se han centrado en el uso de los nanotubos como transportadores de fármacos antitumorales, uniendo dichos fármacos de forma covalente en su superficie (Pastorin *et al.*, 2006), (Chen *et al.*, 2008), (Gu *et al.*, 2011), (Ciobotaru *et al.*, 2014), (Kaur *et al.*, 2017), (Matyszevska *et al.*, 2018). Aunque estos sistemas parecen prometedores, la eficacia de la actividad del fármaco depende mucho de la naturaleza del enlace covalente entre el nanotubo y la molécula en cuestión. Además, como se indicó en la introducción, no siempre es sencillo enlazar el fármaco a la superficie del nanotubo, dependiendo esto de su estructura química, o de su sensibilidad a las condiciones de la reacción.

Una alternativa a dicha unión covalente, es la adsorción del fármaco sobre la superficie del nanotubo mediante interacciones **no-covalentes**. Hay un número creciente de trabajos científicos que demuestran la gran capacidad de los nanotubos de carbono para adsorber diferentes compuestos (Ali-Boucetta *et al.*, 2008), (Liu *et al.*, 2008), (Upadhyayula *et al.*, 2009), (Ji *et al.*, 2010), (Marchesan *et al.*, 2015), (Mallakpour & Soltanian, 2016). El extraordinario potencial de adsorción viene dado principalmente por su elevada área superficial, pero además, también es debido a su estructura unidimensional que hace que presente una superficie de fácil acceso. Basándonos en esta estrategia, en esta tesis se propone llevar a cabo la unión no-covalente entre la superficie del MWCNT y el fármaco antitumoral 5-FU.

El 5-FU es un potente antimetabolito cuyo mecanismo de acción se atribuye a la incorporación errónea de fluoronucleótidos en el ADN y ARN y a la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS), encargada de la síntesis de nucleótidos (Longley *et al.*, 2003), bloqueando las células en la fase S del ciclo. Se trata de un análogo del uracilo con un átomo flúor en lugar de un hidrógeno en la posición C5 (Figura 4.1). El 5-FU se transforma intracelularmente en determinados metabolitos, tales como la fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluorouridina trifosfato (FUTP). El principal mecanismo de activación del 5-FU es su

conversión a fluoridina monofosfato (FUMP). FUMP es posteriormente fosforilada a fluoridina difosfato (FUDP), la cual a su vez puede fosforilarse formando FUTP, o convertirse a fluorodeoxiuridina difosfato (FdUDP) (Figura 4.1). FUTP se incorpora de forma errónea al ARN impidiendo su normal funcionamiento. Por su parte, FdUDP puede fosforilarse o desfosforilarse formando los metabolitos FdUTP y FdUMP, respectivamente. FdUTP puede incorporarse a la molécula de ADN provocando graves daños en la misma (Figura 4.1).

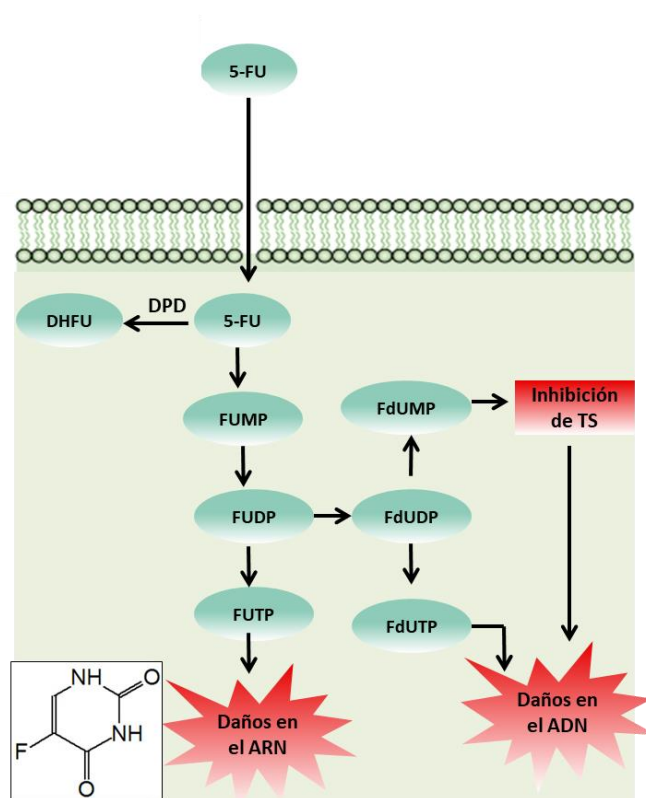


Figura 4.1. Esquema del metabolismo del 5-FU. Adaptada de la ref. (Longley et al., 2003).

Por otro lado, TS cataliza la metilación reductiva de la deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP), con el 5,10-metilentetrahidrofolato (CH_2THF) como donador de metilo. Esta reacción proporciona la única fuente de nuevo timidilato, necesario para la replicación y reparación del ADN. La proteína TS funciona como un dímero, cuyas dos subunidades contienen un sitio de unión a nucleótidos y un sitio de unión para CH_2THF . El metabolito FdUMP se enlaza al sitio de unión a nucleótidos de TS, formando un complejo estable con la enzima y con CH_2THF , y bloqueando de este modo la unión con el sustrato dUMP, lo que causa la inhibición de la síntesis de dTMP (Figura 4.2).

La disminución de dTMP conlleva la disminución de los niveles de desoxitimidina trifosfato (dTTP), que a su vez induce desregulación en los niveles del resto de desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dCTP). Estos desequilibrios alteran gravemente la síntesis y reparación del ADN. Además, la inhibición de TS da como resultado la acumulación de dUMP, que puede conducir a su vez a aumentar los niveles de desoxiuridina trifosfato (dUTP) (Figura 4.2). Tanto el dUTP como el FdUTP se pueden incorporar erróneamente al ADN. Se puede concluir que dado que el ADN y ARN son moléculas esenciales para la división, el crecimiento y el correcto funcionamiento de la célula, el 5-FU provoca la muerte celular al bloquear la célula en la fase S, llevando a la inhibición del crecimiento tumoral.

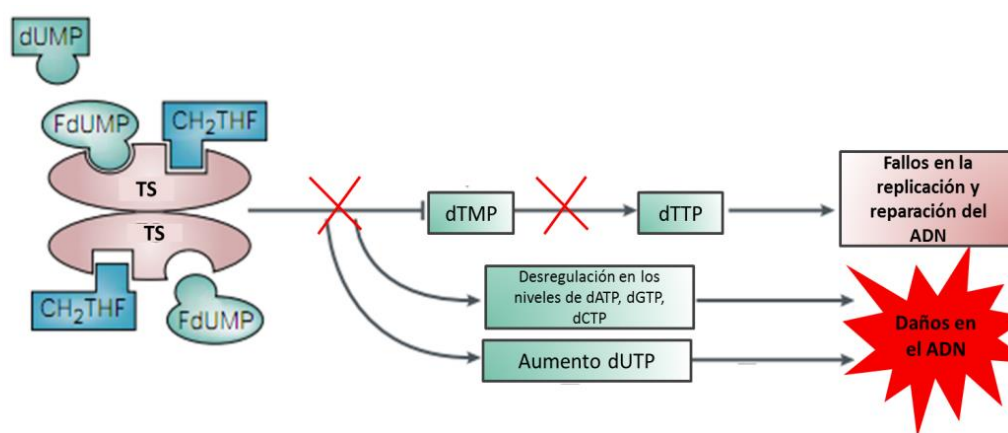


Figura 4.2. Mecanismo de inhibición de la timidilato sintasa (TS) por el 5-FU. Adaptada de la ref. (Longley *et al.*, 2003).

Por otro lado, como el momento de mayor dinámica de los microtúbulos es durante la mitosis (Jordan & Wilson, 2004), los MWCNTs bloquearán a la célula en la fase M del ciclo. De esta forma, se podría bloquear el ciclo celular en dos puntos diferentes (Figura 4.3), lo que puede suponer una herramienta interesante para inhibir la proliferación celular maligna, disminuyendo las posibilidades de aparición de resistencia a los fármacos.

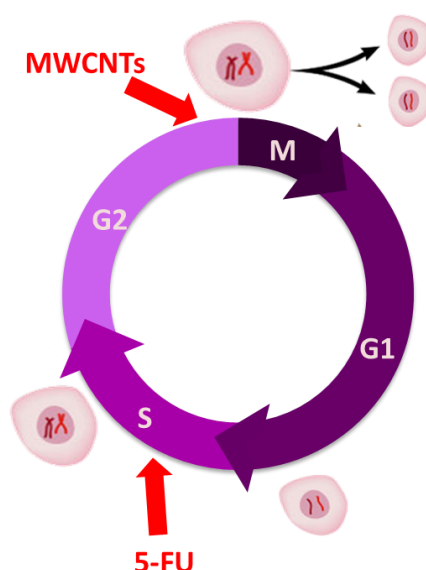


Figura 4.3. Fases del ciclo celular. El 5-FU bloquea a la célula en la fase S del ciclo mientras que los MWCNTs la bloquean principalmente en mitosis (M).

Para determinar la afinidad del 5-FU por la superficie del MWCNT y estudiar si esta interacción es efectiva se ha de considerar la estructura química del 5-FU, que consiste en un anillo hexagonal plano, con dos grupos aminos en las posiciones 1 y 2, y dos grupos carbonilos en las posiciones 2 y 4, además de un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 que se encuentra alternado con el doble enlace del carbonilo de la posición 4 (Figura 4.4). A partir de esta estructura se puede deducir que las interacciones preferentes con las paredes de los MWCNTs serán interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals e interacciones π entre los dobles enlaces (Figura 4.4).

Toński *et al.* han estudiado recientemente los mecanismos por los que se lleva a cabo la adsorción del 5-FU sobre los MWCNTs (Toński *et al.*, 2018). Este estudio corrobora el tipo de interacciones no-covalentes que se había propuesto mediante la observación de sus estructuras químicas. Sin embargo, la finalidad de dicho estudio es muy distinta y consiste en el desarrollo de un sistema de eliminación de los restos de 5-FU de las aguas residuales.

En dicho estudio se demostró que la adsorción de 5-FU se ve desfavorecida cuando los MWCNTs han sido sometidos a procesos oxidativos, los cuales producen grupos polares en su superficie. Este resultado indica que las interacciones claves que determinan la unión entre ambos ocurren directamente entre los anillos de carbono de los MWCNTs y el 5-FU, sugiriendo que predominan las interacciones hidrofóbicas.

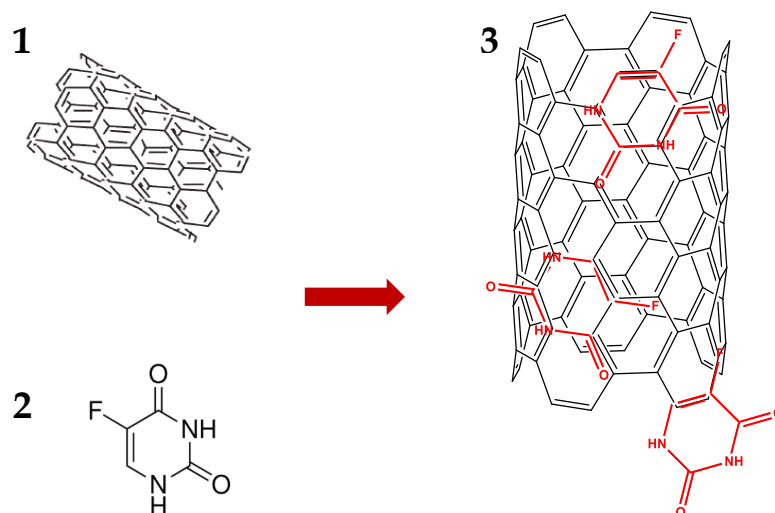


Figura 4.4. Esquema representativo de la interacción no-covalente entre el nanotubo de carbono y el 5-FU. La superficie del nanotubo de carbono pristino (1) favorece interacciones tipo Van der Waals con el anillo hexagonal plano del 5-FU (2), además podrían darse interacciones π - π entre los dobles enlaces de ambos compuestos, como resultado de estas interacciones se obtiene el sistema 5-FU-MWCNT (3). En la figura el MWCNT se representa de forma esquemática con una única capa.

El proceso de adsorción de los diferentes compuestos sobre la superficie de los MWCNTs, puede verse afectado por diferentes factores, como el pH de la disolución, la fuerza iónica, la temperatura, etc. Con respecto a la influencia del pH en la adsorción del 5-FU, Toński *et al.* concluyeron que la adsorción es constante en un rango de pH entre 4 y 9, decreciendo por encima de pH 10. Esto se explica debido a que a pH muy básicos, el 5-FU se encuentra en su forma aniónica, con los dos átomos de nitrógeno desprotonados, haciéndose más polar (Mioduszevska *et al.*, 2017), por lo que las interacciones hidrofóbicas con la superficie apolar de los nanotubos se debilitan. Por otro lado, este resultado indica que a pH fisiológico las interacciones serán estables.

Toński *et al.* también estudiaron la influencia de la presencia de iones en la disolución (fuerza iónica) en el proceso de adsorción del 5-FU. De acuerdo con la literatura, la influencia de la fuerza iónica en el proceso de adsorción depende de los mecanismos que determinan dicho proceso, es decir, del tipo de interacciones no-covalentes que se vean involucradas. Por ejemplo, la fuerza iónica no influye sobre los procesos de adsorción de compuestos como la sulfapiridina y el sulfametoxazol sobre MWCNTs pristinos, los cuales tienen lugar mediante interacciones hidrofóbicas (Ji *et al.*, 2009), mientras que la adsorción de norfloxacin sobre MWCNTs oxidados, la cual depende de interacciones electrostáticas, sí que decrece con el aumento de la

concentración de CaCl_2 . Este hecho encuentra su explicación en la neutralización parcial de las cargas sobre la superficie del nanotubo y la reducción de los puentes de hidrógeno (Yang *et al.*, 2012). Así mismo, la adsorción de metales sobre los nanotubos también decrece con el aumento de la concentración de CaCl_2 , debido a la competencia del catión Ca^{2+} por los sitios activos en la superficie del nanotubo (Ren *et al.*, 2011). En el trabajo de Toński *et al.* se observó que la fuerza iónica no tiene influencia significativa en la adsorción del 5-FU sobre MWCNTs. Esto significa, que el proceso de adsorción tiene lugar principalmente mediante interacciones hidrofóbicas.

Con todo ello, se puede concluir que las interacciones predominantes entre el 5-FU y los MWCNTs son interacciones hidrofóbicas de tipo van der Waals e interacciones entre los enlaces π de ambos anillos, como se propuso inicialmente a partir de la observación de sus estructuras químicas.

4.1.1. Caracterización de los MWCNTs funcionalizados con 5-FU.

Basándonos en los estudios anteriores, se llevó a cabo la funcionalización de los MWCNTs con 5-FU, siguiendo el método descrito en el capítulo III (sección 3.1.1.2), obteniendo como resultado los nanotubos funcionalizados: 5-FU-MWCNTs. La caracterización de dicha funcionalización se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico (TGA) y espectroscopía de fluorescencia.

4.1.1.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Las imágenes de TEM (Figura 4.5) dan una información cualitativa de la funcionalización, mostrando claras diferencias entre la muestra de p-MWCNTs y los nanotubos funcionalizados 5-FU-MWCNTs. Se observa como los p-MWCNTs presentan una pared lateral lisa y clara, mientras que los 5-FU-MWCNTs muestran una alta rugosidad superficial debido a la adsorción del fármaco sobre su superficie. Además hay una clara diferencia entre los grosores de los diámetros de los diferentes tipos de nanotubos, así los 5-FU-MWCNTs presentan a simple vista un diámetro mayor (Figura 4.5).

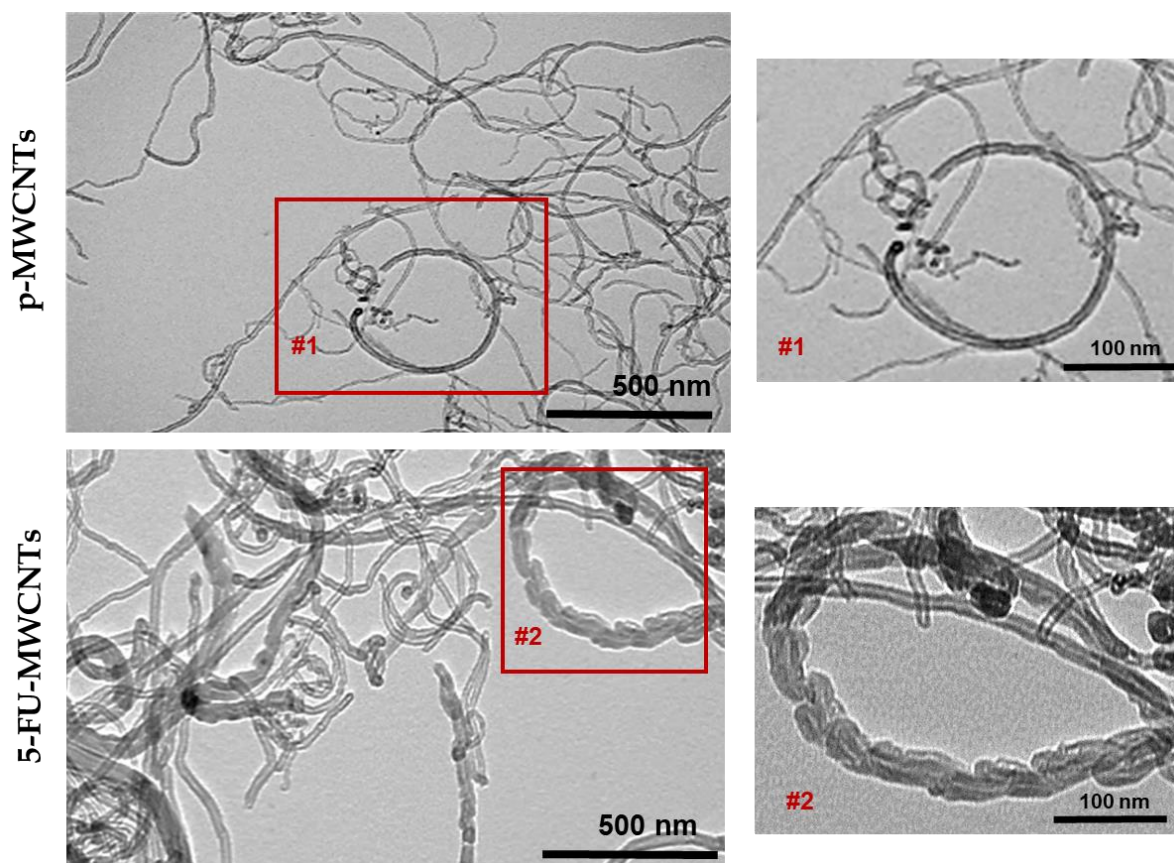


Figura 4.5. Imágenes de TEM de p-MWCNTs y 5-FU-MWCNTs. Los p-MWCNTs presentan una superficie más clara y lisa comparada con los 5-FU-MWCNTs, que presentan una superficie rugosa debido a la adsorción del fármaco.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en otros trabajos científicos en los que se lleva a cabo la funcionalización de MWCNTs con diversos tipos de moléculas. Así, se observaron estructuras similares a las nuestras al caracterizar por TEM nanotubos funcionalizados con vitaminas B2 (Mallakpour & Soltanian, 2015).

Para determinar de forma cuantitativa el aumento en el grosor de los diámetros en los 5-FU-MWCNTs con respecto a los p-MWCNTs, se midió el diámetro de un total de 149 nanotubos en tres puntos diferentes a lo largo del mismo (Figura 4.6B), obteniéndose unos valores medios de los diámetros significativamente diferentes de $17,0 \pm 0,3 \text{ nm}$ para los p-MWCNTs y de $20,3 \pm 0,8 \text{ nm}$ para 5-FU-MWCNTs (Figura 4.6A).

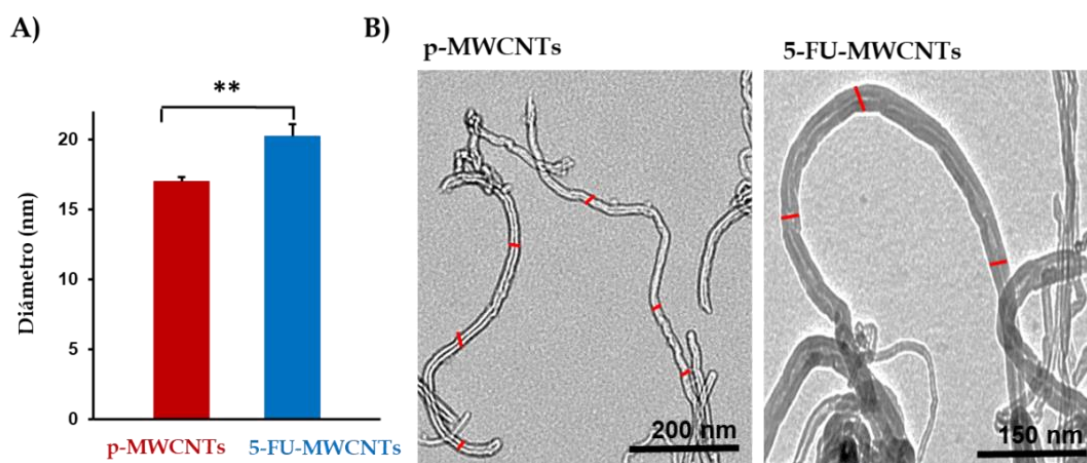


Figura 4.6. Determinación del diámetro medio de los p-MWCNTs (rojo) y 5-FU-MWCNTs (azul).
A) Cuantificación del diámetro medio de 5-FU-MWCNTs (azul) y p-MWCNTs (rojo). 5-FU-MWCNTs son significativamente más anchos que p-MWCNTs ($t=4,04$, $n=147$, $**=t_{.999}$). **B)** Imágenes de TEM de p-MWCNTs y 5-FU-MWCNTs donde se muestra una representación de cómo se realizaron las medidas en tres puntos diferentes a lo largo de cada nanotubo fotografiados aleatoriamente por toda la muestra. Esto se hizo para un total de 149 nanotubos. Las medidas se llevaron a cabo con el programa Image J-NIH, teniendo en cuenta la escala de cada imagen.

4.1.1.2. Análisis termogravimétrico.

Para determinar de forma cuantitativa la cantidad de 5-FU adsorbido sobre la superficie de los MWCNTs se llevó a cabo un análisis termogravimétrico (TGA) (Figura 4.7). En atmósfera de aire, los MWCNTs se descomponen a temperaturas por encima de los 400 °C. Mientras que, debido a su mayor inestabilidad térmica, el 5-FU libre se descompone a una temperatura entre 280-283 °C. En la Figura 4.7 se representa la pérdida de masa en función de la temperatura para la muestra de 5-FU-MWCNTs y el control p-MWCNTs. El termograma muestra una sola caída de masa para la muestra control de p-MWCNTs a temperaturas entre 450 y 650 °C, resultado esperado que está en concordancia con la bibliografía (Silva *et al.*, 2012), (Singh *et al.*, 2009). Sin embargo, para la muestra funcionalizada, se observa una pérdida gradual de masa a medida que aumenta la temperatura, teniendo lugar una primera caída a aproximadamente 280 °C (línea discontinua verde de la Figura 4.7) de un 1.96 %, coincidiendo con la temperatura de descomposición del 5-FU. Tras esta caída la masa sigue disminuyendo hasta llegar a los 400 °C, temperatura a la cual comienzan a descomponerse los MWCNTs, llegando a una pérdida de masa total con respecto al control de un 3.01 % (Figura 4.7).

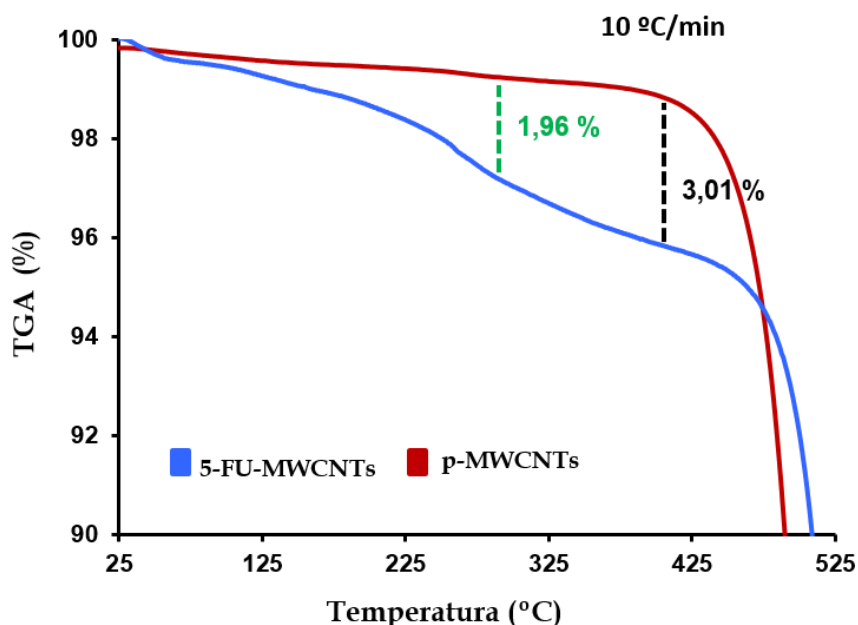


Figura 4.7. Análisis termogravimétrico (TGA) de los p-MWCNTs (rojo) y 5-FU-MWCNTs (azul) en atmósfera de aire. Se observa una pérdida de masa total de un 3.01 % con respecto al control (p-MWCNTs) a 400 °C (línea discontinua negra), temperatura a partir de la cual los p-MWCNTs comienzan a descomponerse. La línea discontinua verde indica una primera caída pronunciada de la masa en la muestra de 5-FU-MWCNTs, la cual coincide con la temperatura de descomposición del 5-FU (~ 280 °C).

La pérdida gradual de masa del 5-FU se puede explicar atendiendo a los diferentes tipos de interacción que se pueden dar con la superficie del nanotubo, siendo algunas de ellas más débiles que las otras. Este hecho es concordante con lo encontrado en la literatura. Campidelli *et al.* muestran un ejemplo de análisis termogravimétrico de varias muestras de NTCs con diferentes grados de funcionalización, observándose en todos los casos una pérdida gradual de masa que además aumenta con el incremento de dicha funcionalización (Singh *et al.*, 2009), (Campidelli *et al.*, 2006).

Atendiendo a los resultados obtenidos en el análisis termogravimétrico, se concluye que aproximadamente el 3 % de la masa de la muestra de 5-FU-MWCNTs se corresponde con 5-FU adsorbido sobre la superficie de los nanotubos.

4.1.1.3. Espectroscopía de fluorescencia.

En último lugar, se utilizó la espectroscopía de fluorescencia para corroborar la cantidad de 5-FU adsorbido sobre la superficie de los MWCNTs. En la Figura 4.8 se muestran los espectros de excitación y emisión del 5-FU.

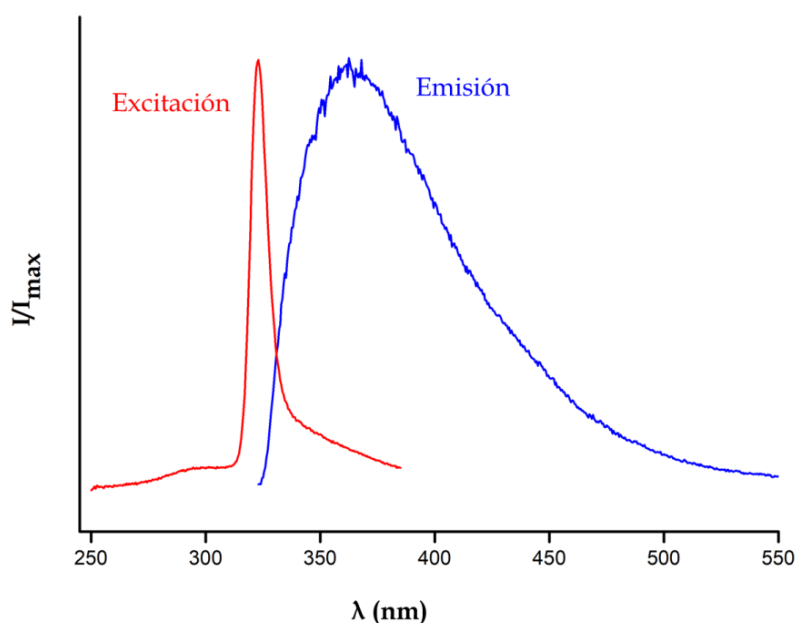


Figura 4.8. Espectros de excitación (rojo) y emisión (azul) del 5-FU. Los espectros están normalizados al máximo de intensidad. El espectro de excitación se llevó a cabo recogiendo a una $\lambda = 455$ nm. El espectro de emisión se obtuvo excitando a una $\lambda = 317$ nm, dando un máximo de emisión a $\lambda = 363$ nm.

En primer lugar, se determinó la curva de calibrado del 5-FU, midiendo la emisión de disoluciones de concentración conocida (Figura 4.9). A continuación, se realizaron medidas de la emisión del sobrenadante obtenido tras centrifugar la muestra una vez funcionalizada, y de las respectivas aguas de lavado (Figura 4.10).

En la Figura 4.9A se muestran los espectros de emisión obtenidos para concentraciones de 5-FU en un rango entre 0.0312 y 10 mg/mL. Se puede observar que para bajas concentraciones (a partir de 0.25 mg/mL), comienza a aparecer una banda cuyo máximo de emisión se encuentra a 356 nm. Esta banda se corresponde con la señal Raman del agua y se superpone con la banda de emisión del 5-FU. Esto ha de tenerse en cuenta a la hora de seleccionar la longitud de onda a la cual se toma la intensidad de emisión para obtener la curva de calibrado.

Se seleccionó una $\lambda = 340$ nm para realizar la curva de calibrado (Figura 4.9B), longitud de onda a la cual no interfiere la señal Raman del agua. Como se observa en la Figura 4.9B), para concentraciones mayores de 0.25 mg/mL comienza a perderse la linealidad, y a partir de 2.5 mg/mL la intensidad de emisión comienza a decrecer debido a que tiene lugar “*quenching*” por concentración o bien a que el haz de excitación se atenúa. Como consecuencia, para una misma intensidad de emisión habrá dos posibles

concentraciones. Para bajas concentraciones ($C < 2.5$ mg/mL) la relación entre intensidad de emisión y concentración de la muestra es lineal (Figura 4.9C), obteniéndose la recta de calibrado $I = 76657C - 552.42$ donde I es la intensidad de emisión en cuentas por segundo y en condiciones prefijadas de anchura de rendija, y C la concentración en mg/mL, con una $R = 0.9986$.

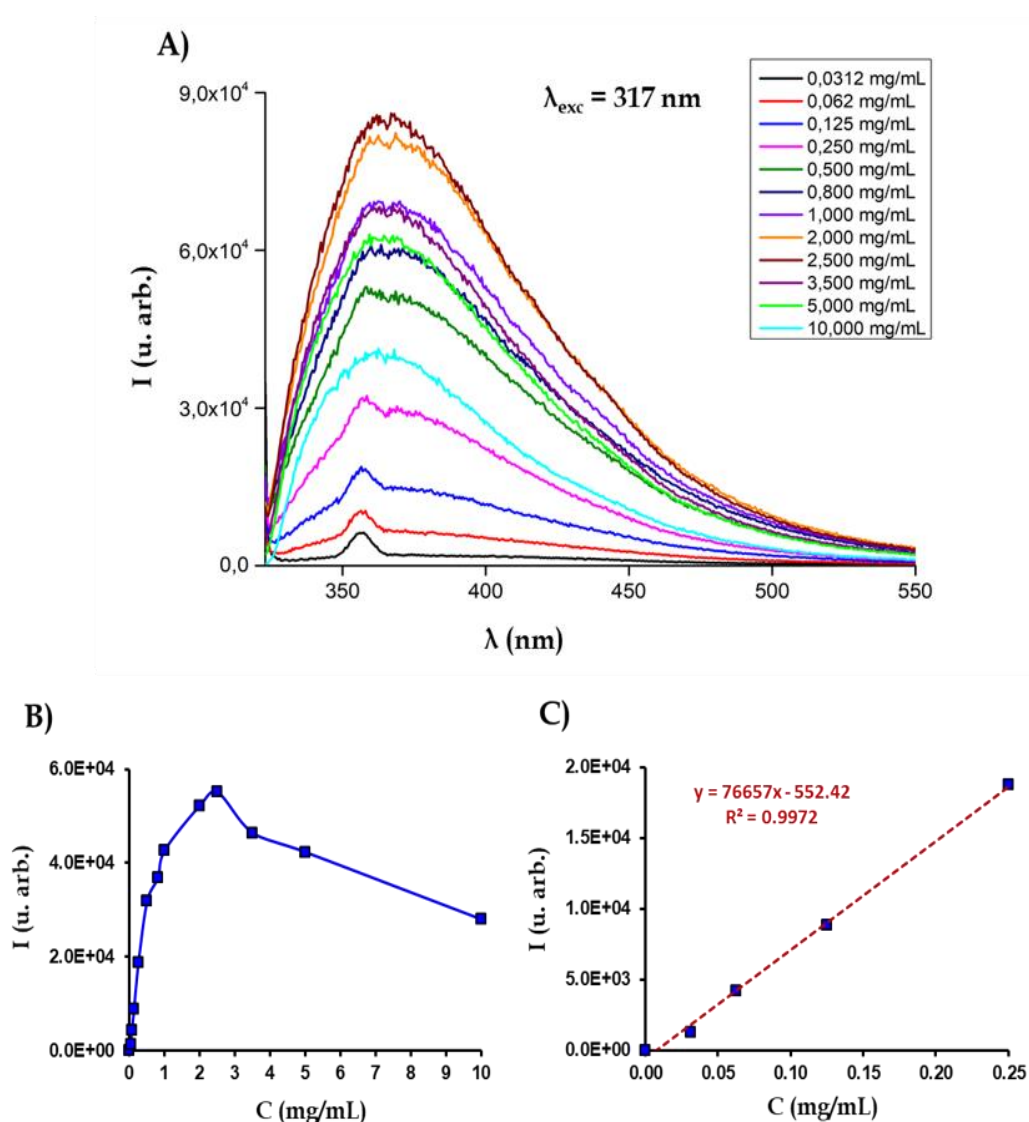


Figura 4.9. Obtención de la curva de calibrado del 5-FU mediante espectroscopía de fluorescencia.

A) Espectros de emisión del 5-FU para un rango de concentraciones entre 0.0312 y 10 mg/mL. A bajas concentraciones (entre 0.25 y 0.0312 mg/mL) comienza a aparecer una banda que presenta su máximo de intensidad en 356 nm, y que se corresponde con la señal Raman del agua. **B)** Curva de calibrado del 5-FU para intensidades de fluorescencia correspondientes a $\lambda = 340$ nm. A partir de 2.5 mg/mL la intensidad de emisión empieza a decrecer, por lo que para una misma intensidad de emisión habrá dos concentraciones posibles. **C)** A bajas concentraciones la relación entre intensidad de emisión (I) y concentración (C) es lineal con un $R = 0.9986$.

Como se explicó en el capítulo III, tras producirse la adsorción del 5-FU, la muestra se centrifugó para separar los restos de fármaco que no han interactuado con la superficie de los MWCNTs. Como resultado de esta centrifugación se obtiene por un lado el *pellet* con la muestra de 5-FU-MWCNTs y, por otro lado, el sobrenadante. Posteriormente, dicho *pellet* se lavó tres veces en agua destilada mediante repetidos ciclos de redispersión-centrifugación. Para determinar la cantidad de 5-FU adsorbida, se midió la emisión del sobrenadante y las aguas de lavado, tal y como se muestra en la Figura 4.10.

Al medir la emisión del sobrenadante, se encontró que para la intensidad de emisión obtenida a 340 nm había dos concentraciones posibles. Para solventar esto se debe diluir el sobrenadante a la mitad de concentración (C/2) y esta segunda muestra se volvió a diluir de nuevo a la mitad (C/4). En la tabla 4.1 se presenta la intensidad de emisión obtenida a 340 nm para las tres muestras. A partir de la curva de calibrado (Figura 4.9B) se determinó a que dos concentraciones puede corresponder dicha intensidad (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Determinación de la concentración correspondiente a la intensidad de emisión del sobrenadante y sus diluciones para una $\lambda=340\text{nm}$.

	$I_{340\text{nm}}$ (u. arb.)	C1 (mg/mL)	C2 (mg/mL)
Sobrenadante	$4.68 \cdot 10^4$	3.5	1.3
Sobrenadante C/2	$4.78 \cdot 10^4$	3.3	1.75
Sobrenadante C/4	$4.04 \cdot 10^4$	5.6	0.875

Para el sobrenadante las posibles concentraciones de 5-FU son 3.5 y 1.3 mg/mL. Cuando se midió la muestra en la que el sobrenadante había sido diluido a la mitad de concentración, los valores que se obtuvieron fueron 3.3 y 1.75 mg/mL, siendo la segunda justo la mitad de 3.5 mg/mL, por lo que se deduce que esta es la concentración a la que se encuentra el 5-FU en el sobrenadante. Esto se corroboró mediante la medida de una tercera dilución, esta vez a la cuarta parte de la concentración original, obteniéndose justo una concentración de 0.875 mg/mL.

Teniendo en cuenta la cantidad inicial que se añadió de 5-FU, al restarle la cantidad de 5-FU que queda en el sobrenadante y en las aguas de lavado se obtiene que, por cada miligramo de MWCNTs se adsorben 0.03 mg de 5-FU (Figura 4.10B), por lo que se corrobora el dato obtenido mediante análisis termogravimétrico, deduciendo que un 3 % del peso de la muestra de 5-FU-MWCNTs corresponde al fármaco.

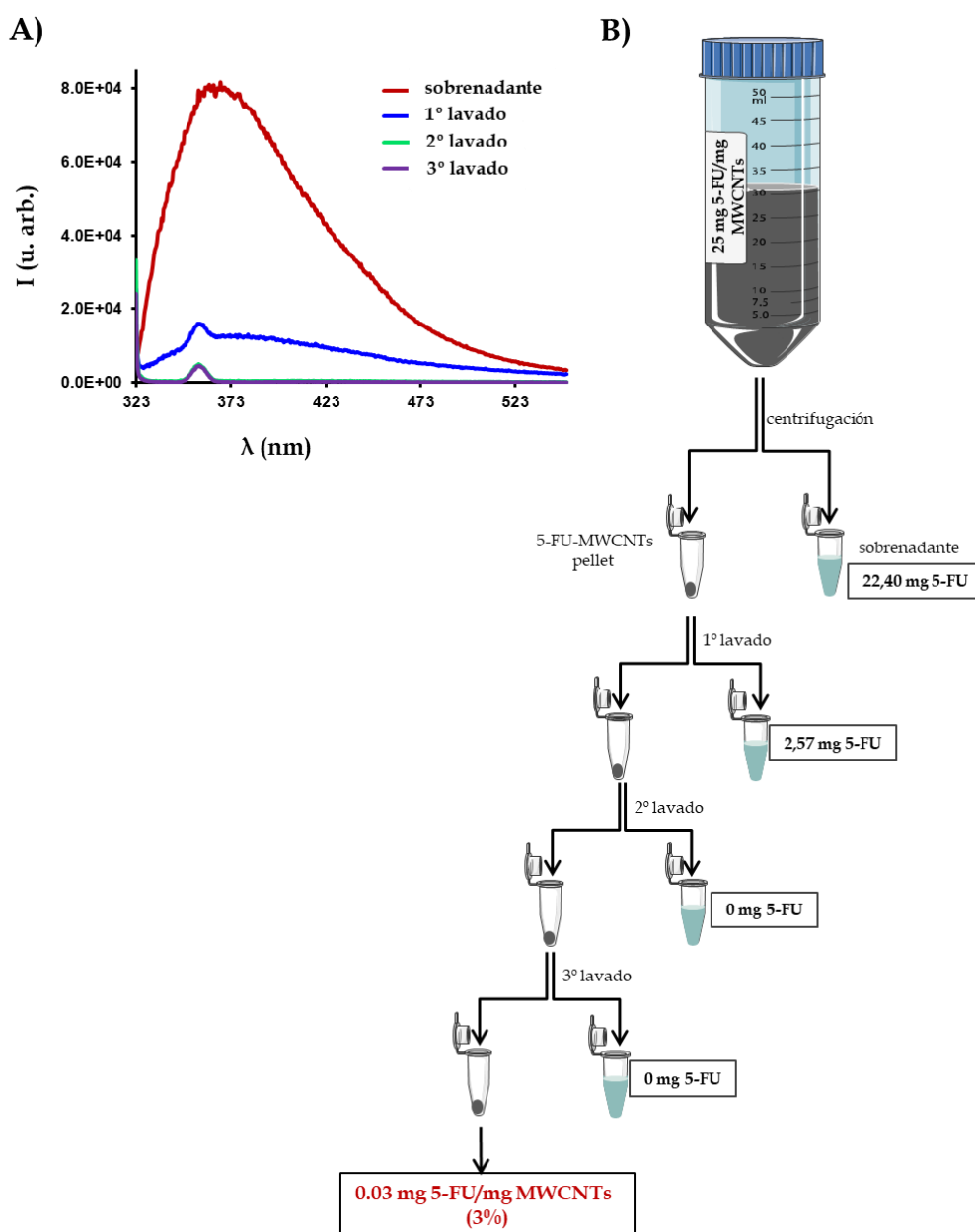


Figura 4.10. Determinación de la concentración de 5-FU adsorbido por diferencia entre la masa usada inicialmente y la que se determinó en el sobrenadante y en las aguas de lavado por espectrometría de fluorescencia. **A)** Espectros de emisión para el sobrenadante y las aguas de lavado. **B)** Esquema representativo del proceso seguido para la determinación de la cantidad de 5-FU adsorbida.

4.1.2. Liberación *in vitro* del 5-FU.

Una vez caracterizada la unión del 5-FU sobre la superficie del MWCNT, se llevó a cabo un estudio de la liberación *in vitro* del fármaco a lo largo del tiempo. Este estudio se realizó en condiciones similares a las fisiológicas, concretamente en PBS (pH=7.4), a la temperatura corporal de 37 °C. Se recogieron muestras a diferentes tiempos y se midió la

concentración de 5-FU presente utilizando espectroscopía de fluorescencia, estimando la diferencia entre el 5-FU presente en el sobrenadante y el que se añadió inicialmente. Las concentraciones se estimaron a partir de una nueva recta de calibrado de disoluciones conocidas de 5-FU en PBS. En la Figura 4.11A se presenta dicha recta de calibrado y la curva de liberación del 5-FU de la superficie del nanotubo a lo largo del tiempo (Figura 4.11B).

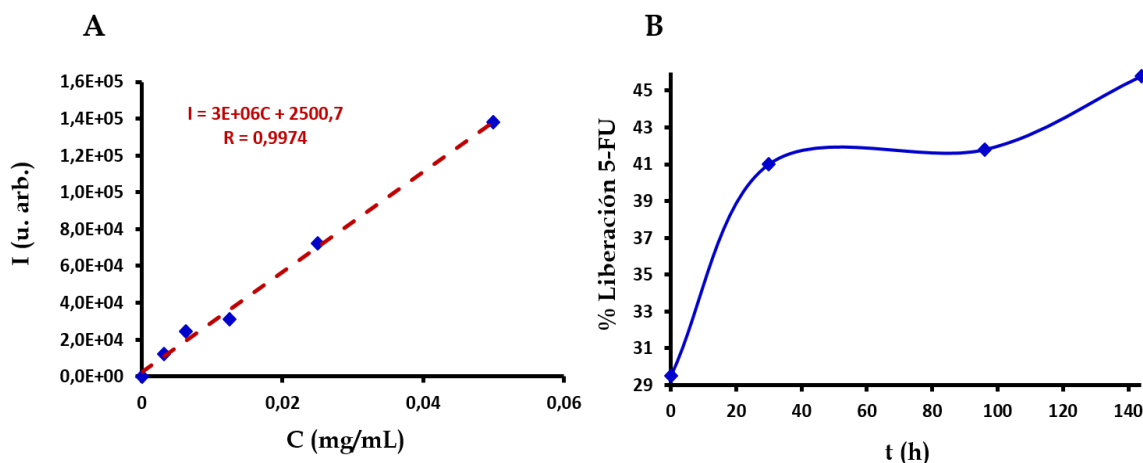


Figura 4.11. Ensayo de liberación *in vitro* del 5-FU fisisorbido en la superficie de los MWCNTs. A) Curva de calibración para el 5-FU disuelto en PBS. Las intensidades de fluorescencia para cada concentración son las correspondientes a una $\lambda = 350$ nm. Se observa una relación lineal entre intensidad de emisión y concentración con un $R=0.9974$. **B)** Porcentaje de liberación del 5-FU con el tiempo en PBS ($pH=7.4$) a $37^\circ C$.

Los resultados obtenidos en la Figura 4.11B muestran como inicialmente se produce una rápida liberación del fármaco, seguido de un patrón más sostenido de liberación posteriormente. Además, se puede concluir que a las 140 horas de exposición al medio, se ha producido una liberación de aproximadamente un 50 % del fármaco fisisorbido.

Estos resultados están en concordancia con lo observado en la literatura (Kaur *et al.*, 2017). La diferencia entre ambos resultados es que en nuestro caso hay una liberación inicial (a los 5 minutos de contacto con el PBS) de aproximadamente un 30 %, mientras que en el trabajo de Kaur *et al.* no observan esa liberación inicial. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que Kaur *et al.* unen el fármaco covalentemente, mientras que en nuestro caso simplemente está fisisorbido, con lo que parte del mismo se intercambiaría con las moléculas del medio. Para evitar esta liberación inicial, que se produciría antes de la entrada de los nanotubos en las células, se ha recubierto el sistema 5-FU-MWCNT con

una biocorona de proteínas séricas. Este recubrimiento proteico evita la exposición plena del fármaco al medio y, por tanto, su fácil intercambio con el mismo.

4.1.3. Liberación del 5-FU en cultivos celulares y evaluación del posible efecto sinérgico con los MWCNTs.

Como se indica en el apartado anterior, el siguiente paso tras la síntesis y caracterización del sistema 5-FU-MWCNT, fue su recubrimiento con una mezcla de proteínas procedentes de suero fetal bovino (FBS) (Fanarraga *et al.*, 2014), como se representa en la Figura 4.12. Esta biocorona proteica tiene otras funciones además de proteger al fármaco de su exposición al medio fisiológico, de esta forma, ayuda a la redispersión de los nanotubos en el medio salino en el cual son completamente insolubles por un lado, mientras que por otro lado activa los mecanismo de entrada en la célula vía endocitosis. De hecho, muchos grupos se han centrado en los últimos años en la importancia de la biocorona proteica y en la determinación de su papel *in vivo* (Marchesan *et al.*, 2015). Según la literatura, la biocorona es determinante para la entrada de los nanotubos en las células, su biodistribución, su reactividad y su posible bio-degradación (Monopoli *et al.*, 2012).

En la fisisorción de proteínas a la superficie de los MWCNTs pueden intervenir muchos tipos de interacciones, incluyendo apilamiento π - π , interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, π -catión, etc. (Xia *et al.*, 2011). Estas interacciones tendrán lugar en los sitios libres de la pared del nanotubo, es decir, en aquellos lugares donde no haya moléculas de 5-FU. Por otro lado, estas interacciones también tienen lugar entre las proteínas y las moléculas de 5-FU adsorbidas previamente a dicha superficie (Figura 4.12).

Probablemente, uno de los mayores problemas que tiene la mayoría de los nanodispensadores de fármacos, es la correcta liberación citoplásmica de los mismos. La mayoría de los sistemas de entrega de fármacos, tras entrar en las células vía endocitosis, quedan atrapados en las vesículas endolisosomales, donde la exposición prolongada a las condiciones hostiles químicas y enzimáticas destruyen a estos nanomateriales y desactivan las terapias. Los MWCNTs ofrecen una solución a este problema, ya que muestran propiedades invasoras extraordinarias siendo capaces de penetrar a través de muchas membranas biológicas diferentes. Además, después de su funcionalización con proteínas, se comportan como nanomateriales inteligentes que interactúan con los

receptores de la superficie celular, activando los mecanismos de endocitosis y quedando confinados transitoriamente dentro de los endosomas. Una vez que se ha formado el endolisosoma, las condiciones químicas y enzimáticas del mismo degradan la biocorona proteica, desnudando el nanotubo, el cual al ser apolar interacciona con la membrana lipídica también apolar del endolisosoma, atravesándola y liberando la terapia al citoplasma celular (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017), (Figura 4.13).

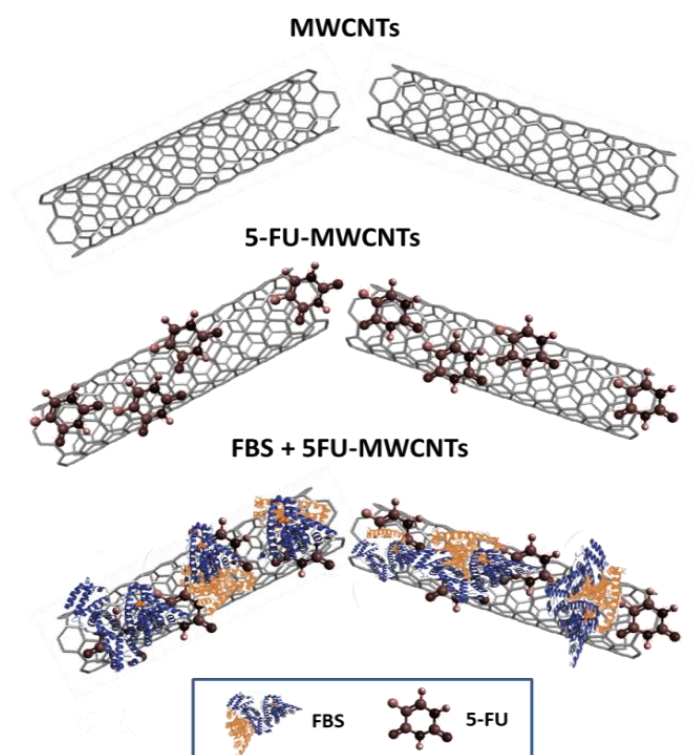


Figura 4.12. Esquema representativo de los pasos seguidos para funcionalizar los MWCNTs con 5-FU y posteriormente con proteínas procedentes de suero fetal bovino (FBS). Los tamaños de las diferentes moléculas no están a escala. Los MWCNTs se representan de forma esquemática con una única capa.

No se tienen pruebas directas del momento exacto en el que se produce la liberación del 5-FU de la superficie del nanotubo en el interior de la célula. Probablemente dicha molécula se intercambie con las moléculas presentes en el medio endolisosomal, y posteriormente salga de la vesícula una vez que los MWCNTs la hayan perforado. La ventaja es que el 5-FU no es degradado por las enzimas presentes en los endolisomas. Las enzimas predominantes en los lisosomas son las **hidrolasas ácidas**, dentro de las cuales se pueden encontrar diferentes tipos como proteasas (degradan proteínas), lipasas y fosfolipasas (degradan lípidos) o fosfatasa (degradan fosfatos de moléculas orgánicas).

Por otro lado, el 5-FU también es estable al pH ácido lisosomal (Arias Mediano, 2003), por lo que no corre peligro de perder su funcionalidad antes de ser liberado al citoplasma.

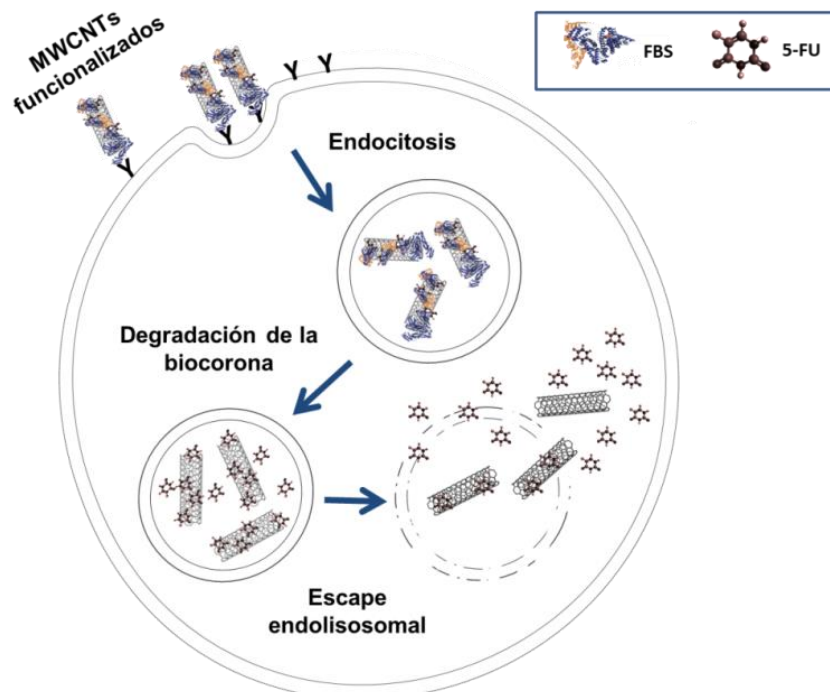


Figura 4.13. Diagrama de la internalización de los 5-FU-MWCNTs funcionalizados con FBS en el interior de una célula y su escape al citoplasma celular vía endolisosomal. La biocorona proteica activa los mecanismos de endocitosis para entrar en las células. Una vez dentro de los endolisomas esta biocorona se degrada por las condiciones ácido-reductoras del medio y los nanotubos quedan descubiertos. Estos nanotubos interaccionan con la membrana endolisosomal hidrofóbica saliendo al exterior del citoplasma y liberando ahí la carga de 5-FU.

4.1.3.1. Liberación del 5-FU en células HeLa. Efecto sinérgico con los MWCNTs.

El siguiente paso tras la funcionalización de los MWCNTs con el fármaco y su posterior recubrimiento con FBS, fue el estudio de liberación de 5-FU en cultivos celulares. Este estudio se llevó a cabo en primer lugar en células HeLa, cuya morfología está muy bien caracterizada, por lo que cualquier cambio será fácilmente detectable.

En la Figura 4.14 se muestran imágenes de contraste de fase de células HeLa que han sido incubadas durante 72 h con 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs (al 3 % de 5-FU), teniendo como controles células sin tratar, células tratadas con 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU (concentración que se corresponde con el 3 % de 5-FU fisisorbido en la superficie de los MWCNTs), y células tratadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs. Las células expuestas a 5-FU-MWCNTs presentan un llamativo aumento de tamaño (contorno rojo) en

comparación con las células control sin tratar o con las tratadas con p-MWCNTs, este aumento de tamaño también se observa en las células tratadas con 5-FU, lo cual es un indicio de que se está produciendo la liberación del fármaco. Se puede explicar el aumento de tamaño, teniendo en cuenta que el 5-FU bloquea a la célula en la fase S del ciclo al impedir la síntesis correcta del ADN. Sin embargo, aunque el ADN no se replique, el resto de orgánulos si lo hacen, por lo que la célula sigue aumentando su biomasa y su tamaño. Por otro lado, las células incubadas con MWCNTs presentan cambios morfológicos a modo de extensiones citoplasmáticas anormales, tal y como viene descrito en la literatura (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012). Estas extensiones también se observan en los cultivos celulares expuestos a 5-FU-MWCNTs (flechas verdes, Figura 4.14).

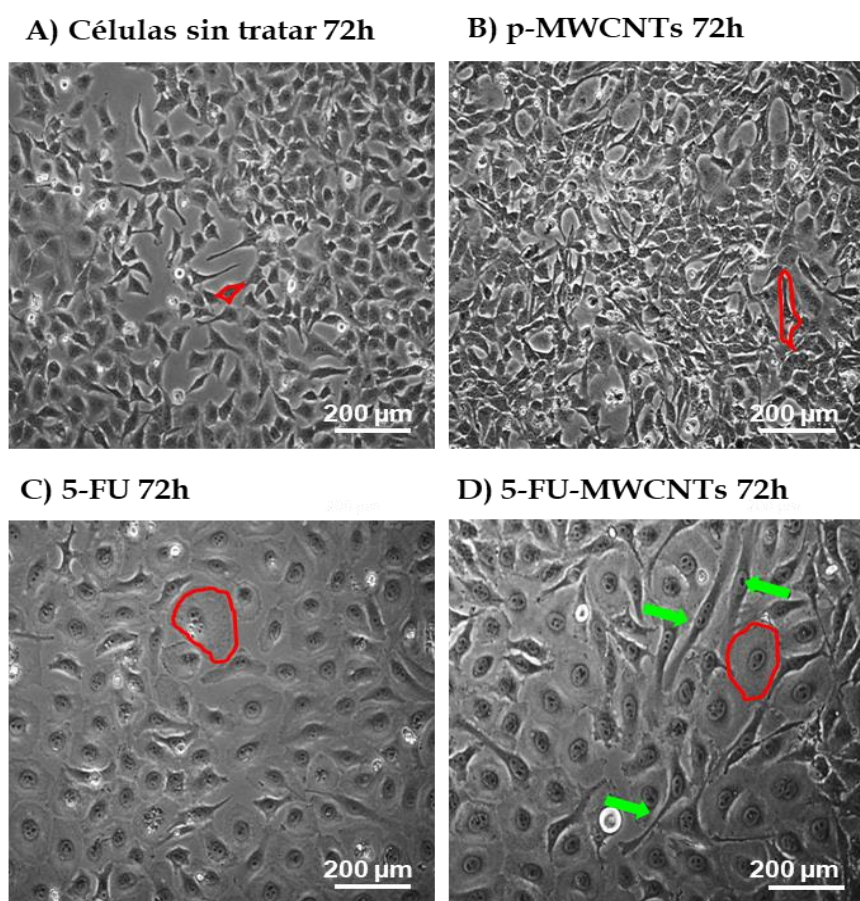


Figura 4.14. Evaluación de los cambios morfológicos producidos por 5-FU-MWCNTs en células HeLa con respecto a los controles a las 72 h de exposición mediante contraste de fase. Imágenes de contraste de fase de células HeLa **A)** sin tratar. **B)** expuestas a 100 µg/mL de p-MWCNTs. **C)** expuestas a 3 µg/mL de 5-FU. **D)** expuestas a 100 µg/mL de 5-FU-MWCNTs. Las líneas rojas muestran una representación de los contornos celulares para cada cultivo y, por tanto, la morfología tipo, observándose un gran aumento de tamaño en las células tratadas con 5-FU (C) y en las tratadas con 5-FU-MWCNTs (D). Las flechas verdes indican extensiones anormales en los citoplasmas características de la presencia de MWCNTs.

Para determinar de forma cuantitativa el aumento de tamaño celular producido por la liberación del 5-FU, se ha estimado el área de un total de entre 75-80 células para cada muestra (Figura 4.15). Como las células no son circulares, se han medido dos longitudes a lo largo de la célula, tal y como se representa en la Figura 4.15A. Al diámetro más largo de la célula se le denominó (y) y al más corto (x). Por un lado, se compararon ambos diámetros para cada cultivo celular, y por otro se obtuvo una estimación del área celular realizando el producto “x·y”.

En la Figura 4.15B se observa que las células tratadas con 5-FU-MWCNTs presentan un aumento significativo del eje “y” con respecto a todos los controles. Por otro lado, el eje “x” también aumenta con respecto al cultivo sin tratar y al tratado con p-MWCNTs. Sin embargo, es menor que el de las células tratadas con 5-FU, que al no estar expuestas a p-MWCNTs, no presentan las extensiones citoplasmáticas características y son, en general, más redondeadas. Así en el cultivo expuesto a 5-FU-MWCNTs se puede observar el fenotipo característico tanto de las células tratadas con p-MWCNTs, como con 5-FU, lo que indica que se está produciendo liberación del fármaco.

En la Figura 4.15C se observan diferencias significativas en el aumento del área celular tras tratar los cultivos con 5-FU-MWCNTs con respecto a las células tratadas con p-MWCNTs. Por otro lado, al compararlo con las células tratadas con 5-FU, se observó que en este caso el área estimada es menor, esto es debido a la presencia de nanotubos que como ya se ha mencionado hace que muchas de las células del cultivo se encuentran alargadas y como vimos anteriormente su “x” es menor, por lo que el producto “x·y” será también más pequeño.

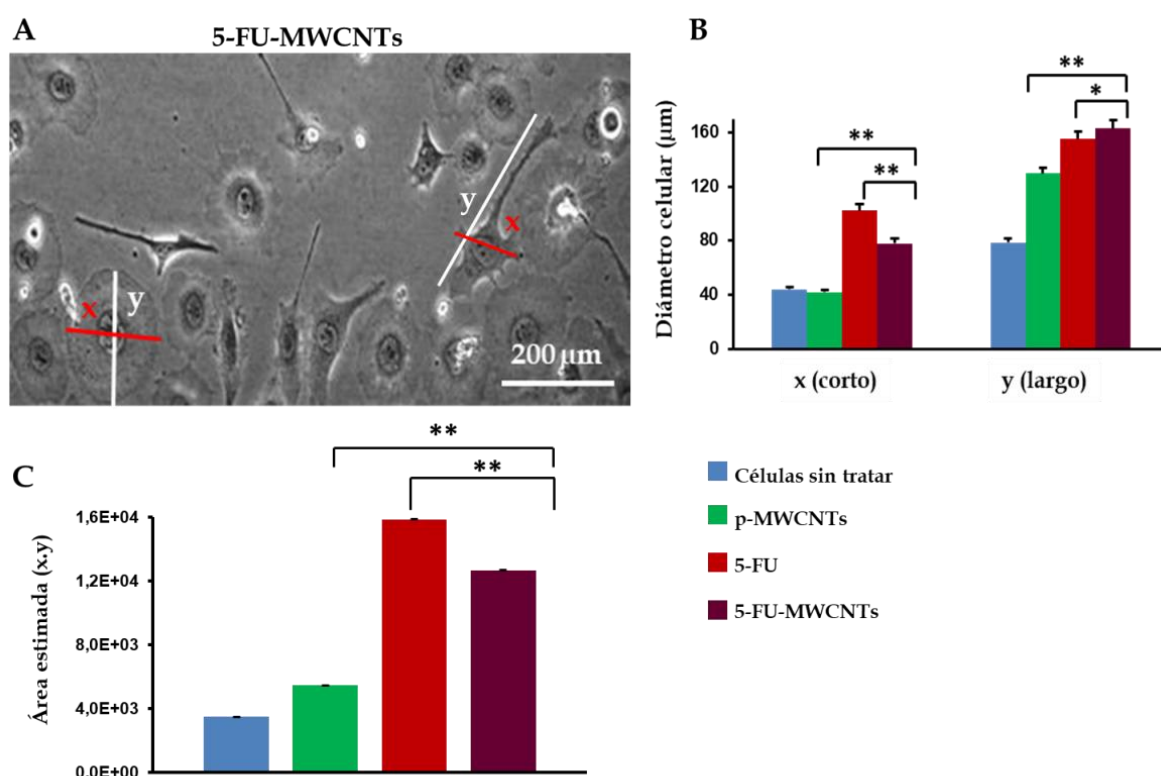


Figura 4.15. Determinación del aumento en el tamaño celular debido a la liberación de 5-FU. **A)** Imagen de contraste de fase representativa de las células tratadas con 5-FU-MWCNTs, donde se puede ver como se han llevado a cabo las medidas de los diámetros celulares (x, rojo) e (y, blanco). **B)** Comparación entre los diámetros (x e y) de los diferentes cultivos celulares. Como se observa en el gráfico, hay diferencias significativas en los tamaños celulares (y) en los cultivos tratados con 5-FU-MWCNTs con respecto al control de p-MWCNTs ($t=4.486$, $n=152$, $**=t_{.9995}$). El lado (y) también aumenta con respecto al cultivo tratado con 5-FU, pero en este caso las diferencias son menores ($t=0.944$, $n=152$, $**=t_{.90}$). Con respecto al lado (x), también hay diferencias significativas con el control p-MWCNTs ($t=7.97$, $n=152$, $**=t_{.9995}$). El lado (x) del cultivo tratado con 5-FU es en este caso significativamente mayor que el tratado con 5-FU-MWCNTs ($t=3.737$, $n=152$, $**=t_{.9995}$). **C)** Comparación entre las áreas estimadas (x·y) de los distintos tipos de cultivos celulares ($n=150$, $**=t_{.9995}$).

Los cambios morfológicos observados mediante contraste de fase, se corroboraron mediante microscopía de fluorescencia confocal (Figura 4.16). Los cultivos tratados con 5-FU-MWCNTs muestran cambios morfológicos propios del tratamiento con 5-FU y con p-MWCNTs. De esta forma, se observan las extensiones citoplasmáticas anormales previamente descritas, junto con una organización acentrosomal de los microtúbulos producida por la presencia de p-MWCNTs (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012). Por otro lado, también se observa el aumento del tamaño celular, que fue cuantificado anteriormente. Junto con el cambio morfológico es también muy significativa la disminución del número total de células en el cultivo. Este fenómeno es característico de

la acción del 5-FU, tal como se observa en el cultivo expuesto a 5-FU libre, y como viene descrito en la literatura (Filgueiras *et al.*, 2013), así se corrobora que este efecto anti-proliferativo es producido por la liberación del 5-FU.

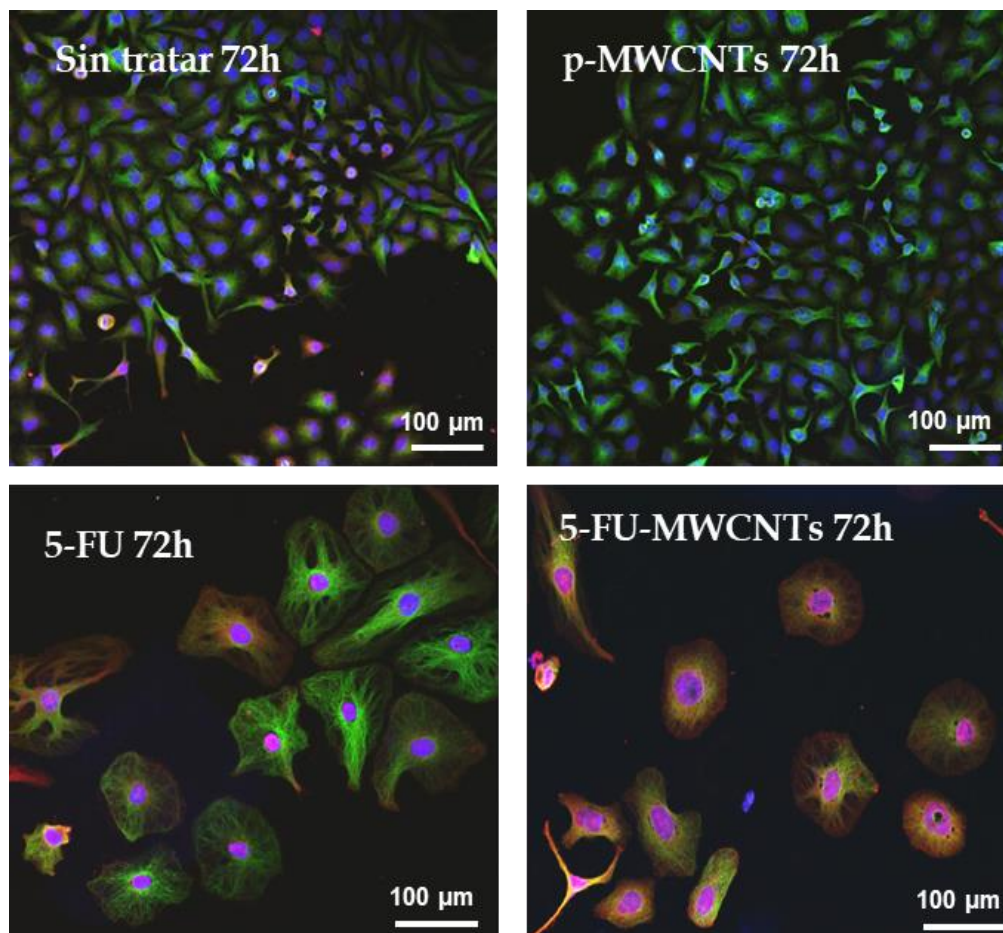


Figura 4.16. Evaluación de los cambios morfológicos producidos por 5-FU-MWCNTs en células HeLa con respecto a los controles a las 72 h de exposición mediante microscopía de fluorescencia confocal. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa sin tratar. Células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs. Células expuestas a 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU. Células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs. En verde se muestran los microtúbulos, en rojo la actina y en azul los núcleos.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de la citotoxicidad mediante citometría de flujo (Figura 4.17). Para ello, se incubaron células HeLa durante 72 h con 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs, con los respectivos controles anteriormente mencionados. Este estudio demuestra que las células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs en el medio de cultivo durante 72 h presentan un aumento considerable de la apoptosis con respecto a los controles. Estos datos además revelan el ya mencionado bloqueo en la fase S del ciclo celular, característico del efecto del 5-FU, que como se mencionó con anterioridad, impide

la síntesis del ADN al inhibir la enzima TS. Este bloqueo del ciclo sugiere un bloqueo de la proliferación celular, lo cual explica el aumento de la tasa de apoptosis.

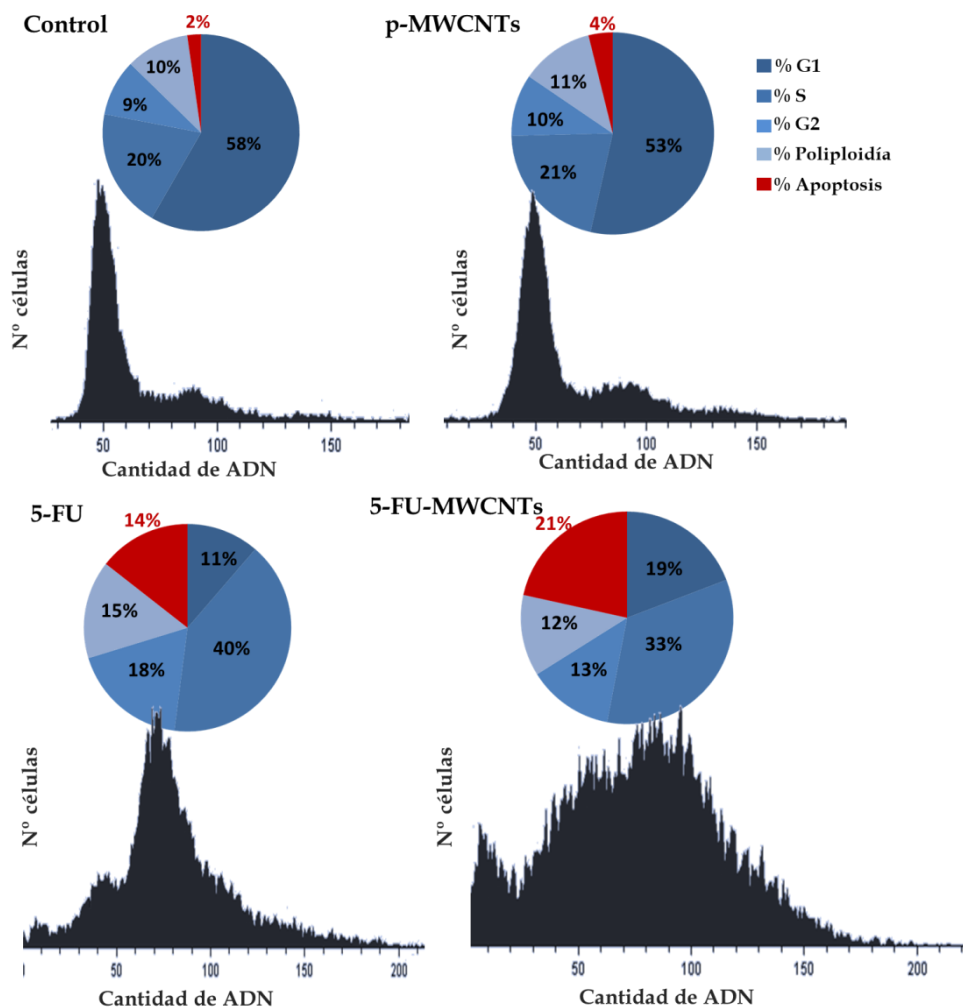


Figura 4.17. Efecto citotóxico de 5-FU-MWCNTs en células HeLa medido por citometría de flujo. Citometría de flujo de células HeLa sin tratar, células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs, células expuestas a 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU y células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs, durante 72 h. Los cambios en el ciclo celular son indicativos de un aumento del efecto anti-proliferativo y citotóxico de los 5-FU-MWCNTs con respecto a los controles. En rojo se presentan los histogramas obtenidos para más de 10000 células donde se representa la cantidad de ADN que presenta cada población celular.

Si se compara la apoptosis producida por el 5-FU-MWCNTs (21 %), con la suma de la apoptosis producida por el p-MWCNTs y el 5-FU por separado ($4+14= 18\%$), se puede deducir que se produce un aumento del efecto citotóxico al tratar las células malignas con el 5-FU-MWCNT, potenciándose el efecto producido por ambos elementos por separado.

Por último, se empleó otra técnica para corroborar los resultados de la viabilidad celular en los cultivos de células HeLa expuestas a 5-FU-MWCNTs y a los respectivos controles, esta vez a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) (Figura 4.18). Para ello las células

mueras por necrosis se tiñeron con azul de tripan, y se determinó la supervivencia celular mediante conteo con cámara de Neubauer (ver capítulo III, sección 3.2.3).

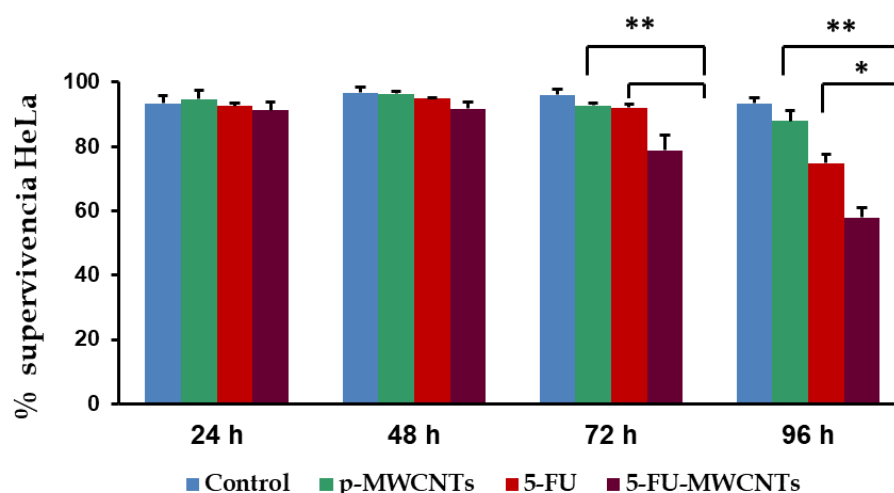


Figura 4.18. Viabilidad de las células HeLa expuestas a 5-FU-MWCNTs. Se determinó el porcentaje de supervivencia celular de las células HeLa a las 24, 48, 72 y 96 h. En azul aparece la supervivencia para las células sin tratar, en verde para las tratadas con 100 µg/mL de p-MWCNTs, en rojo para las tratadas con 3 µg/mL de 5-FU y, por último, en morado para las tratadas con 100 µg/mL de 5-FU-MWCNTs. Se observan diferencias significativas entre las células tratadas con p-MWCNTs y 5-FU-MWCNTs ($t=2.686$, $n=4$, $**=t_{.975}$); ($t=2.82$, $n=4$, $**=t_{.975}$) a las 72 y 96 h, respectivamente. Menos diferencias se encontraron entre 5-FU y 5-FU-MWCNTs tanto a las 72 como a las 96 h ($t=0.74$, $n=3$, $=t_{.70}$), ($t=1.56$, $n=4$, $*=t_{.90}$).

Mediante este ensayo se determina la muerte celular por necrosis, observando que hay diferencias significativas a las 72 y 96 h en la muerte producida con 5-FU-MWCNTs con respecto al control de p-MWCNTs, y que estas diferencias son menores con respecto al 5-FU libre. Por otro lado, si se suman las muertes producidas a las 72 h por 5-FU y p-MWCNTs por separado ($3.9+3.3= 7.2$ %) y se compara con la producida por 5-FU-MWCNTs (17.2 %) se puede concluir que ha habido liberación del 5-FU y que además se produce un efecto sinérgico en el aumento de la muerte celular por necrosis. Este efecto es aún mayor a las 96 h, en la que los valores de muerte celular son de ($18.5+5.4= 23.9$ %) para los controles por separado, y de (35.4 %) para el 5-FU-MWCNTs.

4.1.3.2. Liberación del 5-FU en célula de melanoma maligno de ratón (B16F10). Efecto sinérgico con los MWCNTs.

Tras los resultados expuestos anteriormente en células HeLa, se realizó el estudio de liberación del 5-FU y el análisis de su efecto citotóxico en células de melanoma maligno de ratón de la línea B16F10. Se eligió esta línea celular debido a que será la que

posteriormente se trasplante a los ratones neonatos albinos para el desarrollo de tumores y la realización de los estudios *in vivo*.

Las células B16F10 se incubaron en presencia de 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs y los respectivos controles durante diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) y se analizaron en primer lugar los efectos producido mediante microscopía de fluorescencia confocal (Figura 4.19).

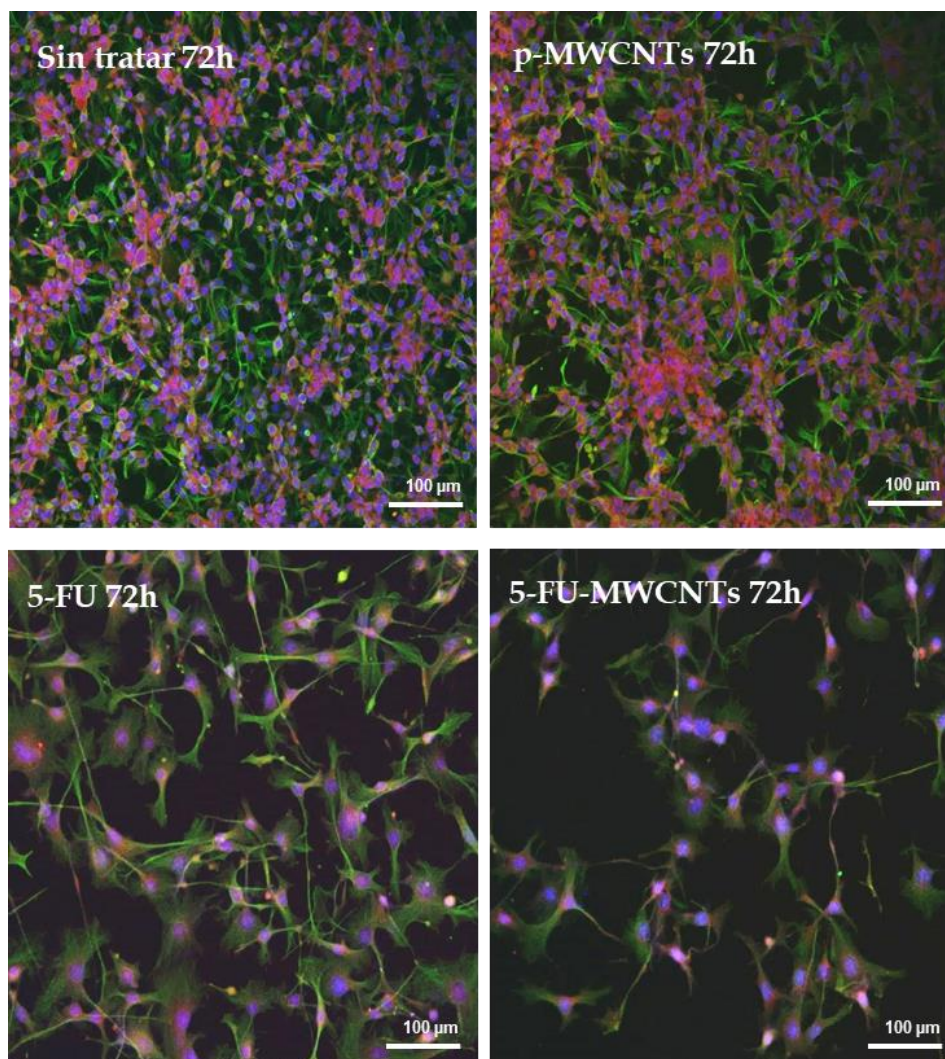


Figura 4.19. Evaluación de los cambios morfológicos producidos por 5-FU-MWCNTs en células B16F10 con respecto a los controles a las 72 h de exposición mediante microscopía de fluorescencia confocal. Imágenes de microscopía confocal de células B16F10 sin tratar. Células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs. Células expuestas a 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU. Células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs. En verde se muestran los microtúbulos, en rojo la actina y en azul los núcleos.

En los cultivos tratados con 5-FU-MWCNTs se muestran cambios morfológicos propios del tratamiento con 5-FU y con p-MWCNTs. El aumento de tamaño de las células

con respecto al control de células sin tratar o las tratadas con p-MWCNTs es el cambio más característico que se observa. Este aumento del tamaño celular también se observa en el cultivo tratado con 5-FU, y como se explicó anteriormente es debido a que la célula, aunque esté bloqueada en fase S, sigue creciendo porque el resto de orgánulos y de biomasa se sigue replicando.

Junto con el cambio morfológico también es muy significativa la disminución del número total de células en el cultivo, resultado similar al obtenido en células HeLa. Este fenómeno es característico de la acción del 5-FU, tal como se observa en el cultivo expuesto a 5-FU libre. Así se corrobora de nuevo que a las 72 h de incubación en cultivos celulares ya se ha producido liberación del 5-FU en el interior de la célula y que está ejerciendo su efecto anti-proliferativo y citotóxico.

A continuación, como en el caso de las células HeLa, se llevó a cabo un estudio de la citotoxicidad mediante citometría de flujo. Las células B16F10 fueron incubadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs junto con los respectivos controles anteriormente mencionados durante 72 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.20. De nuevo se observa que las células expuestas a 5-FU-MWCNTs presentan bloqueo en la fase S del ciclo de modo similar a lo que ocurre en las células tratadas exclusivamente con 5-FU. Además, este cultivo presenta un aumento de la apoptosis con respecto a los controles. En este caso la apoptosis producida por el 5-FU-MWCNTs es de un **27 %**, mientras que en el caso del 5-FU libre provoca un 17 % de apoptosis, que sumado con el 9 % de los p-MWCNTs darían un **26 %** en total. Así se puede concluir, que aunque en este caso no se observa tanta diferencia entre la suma de los controles y la muestra tratada con 5-FU-MWCNTs como en las células HeLa, sin embargo sí que se potencia el efecto del fármaco libre, por lo que se puede decir que los MWCNTs pueden actuar como una terapia adyuvante.

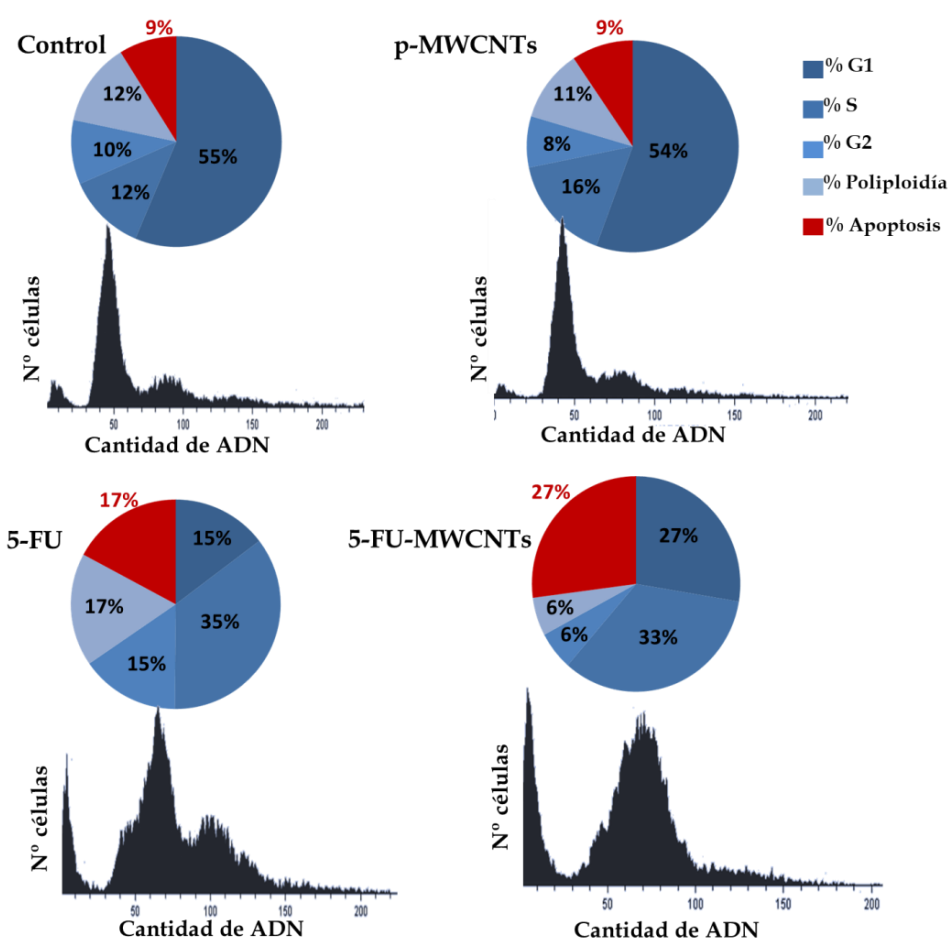


Figura 4.20. Efecto citotóxico de 5-FU-MWCNTs en células B16F10 medido por citometría de flujo. Citometría de flujo de células B16F10 sin tratar, células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs, células expuestas a 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU y células expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs, durante 72 h. Los cambios en el ciclo celular son indicativos de un aumento del efecto anti-proliferativo y citotóxico de los 5-FU-MWCNTs con respecto a los controles. En rojo se presentan los histogramas obtenidos para más de 10000 células donde se representa la cantidad de ADN que presenta cada población celular.

Por último, se determinó la viabilidad de las células B16F10 expuestas a 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) midiendo el grado de necrosis producido, tal y como se hizo con las células HeLa (Figura 4.21). En este ensayo se concluye que hay diferencias significativas en la muerte por necrosis entre las células cultivadas con 5-FU-MWCNTs y los respectivos controles. Además, se compara la suma de las necrosis producidas por los p-MWCNTs y el 5-FU por separado ($7 + 5.3 = 12.3 \%$), ($8.9 + 8.9 = 17.8 \%$) a las 72 y 96 h respectivamente, con las obtenidas en los cultivos incubados con 5-FU-MWCNTs (15.7%) y (18.3%) (Figura 4.21). Se puede concluir que aunque en este caso hay una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto a los controles, lo que indica que se potencia el efecto del fármaco antitumoral

5-FU mediante la acción de los nanotubos, sin embargo las diferencias con respecto a la suma de la acción de los controles por separado es menor que en el caso de las células HeLa. Este resultado corrobora lo obtenido previamente mediante citometría de flujo.

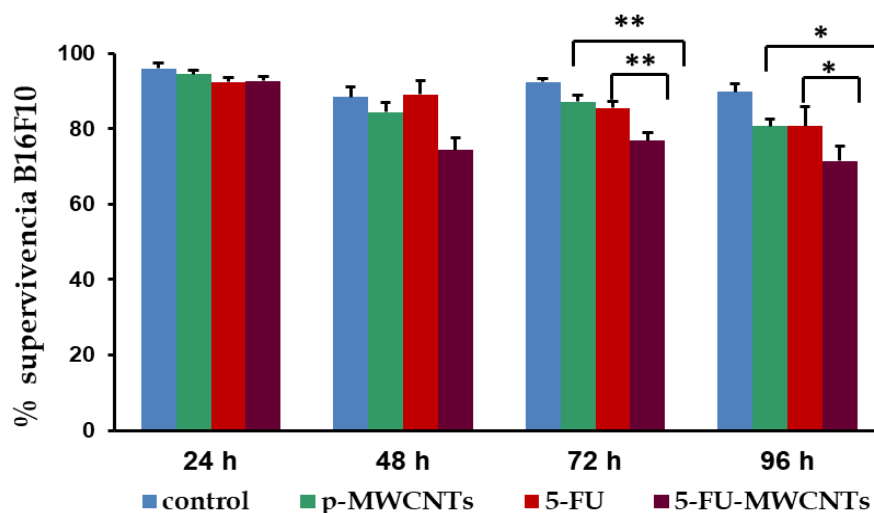


Figura 4.21. Viabilidad de las células B16F10 expuestas a 5-FU-MWCNTs. Se determinó el porcentaje de supervivencia celular en células de melanoma maligno de ratón B16F10 a las 24, 48, 72 y 96 h. En azul aparece la supervivencia para las células sin tratar, en verde para las tratadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs, en rojo para las tratadas con 3 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU y, por último, en morado para las tratadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU-MWCNTs. Se observan diferencias significativas entre las células tratadas con p-MWCNTs y 5-FU-MWCNTs ($t=3.673$, $n=6$, $**=t_{.995}$); y entre 5-FU y 5-FU-MWCNTs ($t=3.028$, $n=6$, $**=t_{.99}$) a las 72. A las 96 h, se encontraron diferencias aunque el grado de confianza es menor. p-MWCNTs frente a 5-FU-MWCNTs ($t=1.448$, $n=4$, $*=t_{.90}$), 5-FU frente a 5-FU-MWCNTs ($t=2.157$, $n=4$, $*=t_{.95}$).

A la vista de los resultados obtenidos, queda de manifiesto que se produce liberación del 5-FU tanto en células HeLa como en B16F10, y además que mediante este mecanismo de entrega de fármaco que se ha diseñado, se potencia la acción citotóxica que tienen por separado el 5-FU y los p-MWCNTs. Sin embargo, en el caso de las células de melanoma de ratón B16F10, al ser células tumorales más resistentes que las HeLa, la diferencia en el efecto citotóxico con respecto a los controles es menor que la que tiene lugar en HeLa. En este tipo de células sería necesario una mayor dosis de 5-FU-MWCNTs o bien combinar esta terapia con otras terapias adyuvantes.

4.1.4. Efecto del tratamiento de los 5-FU-MWCNTs en un modelo de tumores sólidos *in vivo*.

Una vez validada la liberación del 5-FU, adsorbido sobre la superficie de los nanotubos mediante interacciones no-covalentes, y estudiado su efecto citotóxico *in vitro*

en cultivos de células HeLa y de melanoma maligno de ratón B16F10, el siguiente objetivo que se planteó fue la validación de estos resultados en tumores sólidos.

El modelo elegido para llevar a cabo este estudio fue el modelo de alotransplante de melanoma maligno murino (B16F10), en ratones neonatos albino (CD-1) desarrollado en nuestro laboratorio (García-Hevia *et al.*, 2016a), (ver capítulo I, sección 1.2.1.2 y capítulo III sección 3.3).

Actualmente, el mejor tratamiento de los melanomas es su pronóstico precoz y la extirpación quirúrgica, ya que las terapias antineoplásicas actuales solamente tienen un valor paliativo en este tipo de cánceres. El uso de sistemas multitierapia, tal y como se propone en esta tesis, aprovechando la capacidad intrínseca de los MWCNTs de interaccionar con los microtúbulos inhibiendo su biomecánica y, por otro lado, potenciar este efecto con el de fármacos antineoplásicos que transporte en su superficie, supondría una revolución en el tratamiento de este tipo de cánceres, pudiendo disminuir la posibilidad de aparición de quimioresistencias.

Para evaluar el efecto antitumoral del sistema 5-FU-MWCNTs, se llevó a cabo **una única inyección** intratumoral de 2 μg de 5-FU-MWCNTs resuspendidos en 10 μL de medio de cultivo (DMEM, 30 % FBS) usando gentamicina como antibiótico, junto con los respectivos controles, 2 μg de p-MWCNTs, 0.06 μg de 5-FU, y tumores tratados solamente con el medio de resuspensión de los nanotubos (control), todos pinchados dentro de una misma camada. Al cabo de 4 días de tratamiento, se diseccionaron los tumores y se pesaron (Figura 4.22).

El 5-FU-MWCNTs produce una reducción de la masa del tumor de un 58 % después de 4 días de tratamiento con respecto al tumor control tratado con medio de resuspensión. Se observa también una reducción significativa de la masa con respecto a los controles de 5-FU y de p-MWNTs, por lo que se puede concluir que el sistema de entrega y liberación del 5-FU desarrollado potencia el efecto antitumoral del fármaco 5-FU libre.

Por otro lado, si se compara este valor con la suma de las reducciones producidas por el 5-FU y los p-MWCNTs administrados independientemente ($23+46 = 69 \%$) se puede concluir que en este caso no se aprecia un efecto sinérgico.

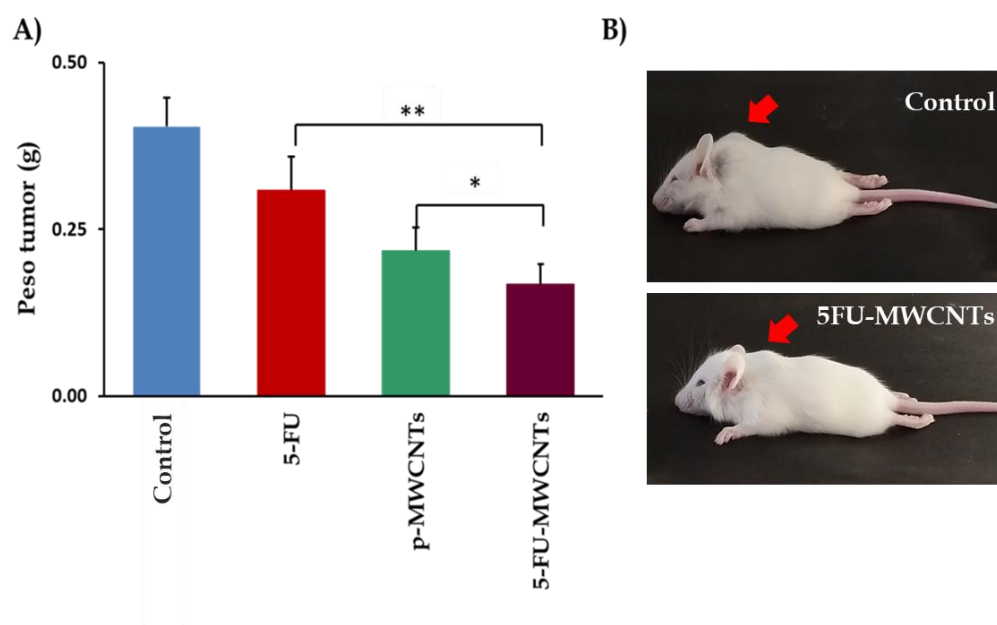


Figura 4.22. Evaluación del efecto antitumoral in vivo en tumores de melanoma de ratón. A) Análisis estadístico del efecto de una sola inyección de 5-FU-MWCNTs y de los controles. El tamaño tumoral medio fue significativamente menor que los tratados con 5-FU ($t=3.6$, $n=75$, $^{**}=t_{.99}$) y que los tratados con p-MWCNTs ($t=1.31$, $n=87$, $^{*}=t_{.975}$). **B)** Foto de dos ratones de la misma camada representativos utilizados para el experimento in vivo, donde los ratones inyectados con 5-FU-MWCNTs tienen tumores más pequeños a simple vista que los tumores control tratados con medio de resuspensión de los nanotubos (control), (flecha roja).

4.1.5. Discusión de los resultados.

El 5-FU se ha utilizado durante los últimos 50 años para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres (Miura *et al.*, 2010). El principal problema de este fármaco, como el de la mayoría de los fármacos antineoplásicos, es que al ataca a todas aquellas células que proliferan, ya sean sanas o cancerígenas, lo que conlleva a la aparición de efectos secundarios no deseados. Por otro lado, las células tumorales han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a estos fármacos (Luqmani, 2005), esto hace que esta terapia tradicionalmente usada contra el cáncer no sea totalmente efectiva.

Como alternativa, en esta tesis se propone aprovechar las excelentes propiedades de superficie de los MWCNTs para utilizarlos como nanotransportadores del 5-FU. Se ha conseguido que ambos compuesto interaccionen no-covalentemente mediante un procedimiento muy sencillo y poco agresivo, que respeta la funcionalidad del fármaco. Por otro lado, también se aprovecha la capacidad de los nanotubos para atravesar

diferentes tipos de membranas celulares para que la entrega del fármaco en el citoplasma celular sea efectiva.

El recubrimiento de estos nanotransportadores con una biocorona proteica permite proteger el fármaco de su continua exposición al medio fisiológico, y además, activa los mecanismos de entrada a la célula vía endocitosis. La mayoría de sistemas de entrega de fármacos quedan atrapados en las vesículas endolisosomales, exponiendo los fármacos que transportan a las fuertes condiciones ácido-reductoras y enzimáticas allí presente y, por tanto, provocando la degradación e inactivación de los mismos antes de que ejerzan su función. Los MWCNTs, sin embargo, son capaces de atravesar la membrana lipídica endolisosomal (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017), liberando el fármaco en el citoplasma celular y permitiendo que actúe la terapia.

Por otro lado, aprovechando el efecto citotóxico (García-Hevia *et al.*, 2015b), anti-proliferativo, anti-migratorio (García-Hevia *et al.*, 2015a) y antitumoral (García-Hevia *et al.*, 2016b) de los MWCNTs, en este trabajo se ha desarrollado un sistema de doble ataque a las células tumorales, de tal forma que se bloquea la proliferación celular maligna en dos puntos diferentes del ciclo, disminuyendo así las posibilidades de aparición de posibles resistencias.

Por último, teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, se puede utilizar el sistema desarrollado en esta tesis para acoplarlo a otras estructuras, que permitan encapsular a su vez otras terapias alternativas en su interior, y que utilicen la capacidad para penetrar barreras celulares de los MWCNTs, para liberar dichas terapias en el citoplasma celular. Se estaría así ante un sistema multiestructurado de liberación multitierapia que permitiría atacar el cáncer desde diferentes vías.

4.2. Estudio y mejora de la biodegradación de los MWCNTs manteniendo su efecto antitumoral.

Atendiendo a los resultados obtenidos hasta el momento, los MWCNTs podrían suponer una eficaz herramienta para el tratamiento del cáncer, tanto por su efecto intrínseco citotóxico y antitumoral, como por sus excelentes propiedades superficiales, que les permiten ser utilizados como sistemas de transporte y liberación de fármacos.

Desafortunadamente, a pesar de estos interesantes resultados, queda un largo camino antes de que se puedan usar en aplicaciones clínicas. Los únicos ensayos clínicos con nanotubos de carbono existentes hasta la fecha comenzaron en el año 2011. En ellos los nanotubos están únicamente presentes como componentes de dispositivos médicos externos para el diagnóstico del cáncer (Marchesan *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que la bioacumulación de los nanotubos de carbono en diferentes órganos y tejidos puede causar múltiples daños. Entre los efectos secundarios no deseados que desencadenan se pueden destacar reacciones inflamatorias, citotoxicidad, rotura del ADN, mal-segregación cromosómica, etc. (Madani *et al.*, 2013), (Rittinghausen *et al.*, 2014), (Kostarelos, 2008).

En algunos trabajos científicos se ha comparado su toxicidad con la del asbesto debido a la similitud de su morfología (Madani *et al.*, 2013), (Poland *et al.*, 2008). Las fibras de asbesto son cristales aciculares que actúan principalmente en el sistema respiratorio. Debido a su ligero peso, pueden permanecer en suspensión en el aire y ser fácilmente inhalados, causando patogenicidad pulmonar (Lam *et al.*, 2004). Ravichandran *et al.* comprobaron en uno de sus estudios que las células epiteliales de pulmón de rata tratadas con MWCNTs sufrían apoptosis debido a que se producía daño mitocondrial, el cual finalmente guiaba a daño lisosomal (Ravichandran *et al.*, 2009). La desestabilización de las membranas lisosomales conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis debido a que el lisosoma lesionado libera enzimas digestivas que dañan a las células (Andón & Fadeel, 2013). Por otro lado, se observó que los nanotubos de carbono pueden provocar una disminución del potencial de membrana mitocondrial, que da como resultado la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Un alto nivel de ROS es indicativo de estrés oxidativo y puede dañar las células alterando la estructura de las proteínas y del ADN, interfiriendo con las funciones de señalización y modulando la transcripción génica. Esto, eventualmente, podría desembocar en cáncer, enfermedad renal, neurodegeneración, enfermedad cardiovascular o pulmonar. El efecto del alto nivel de ROS tiene aún más influencia en el sistema nervioso central debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados que son susceptibles a la peroxidación (Sharifi *et al.*, 2012).

Los factores que determinan la toxicidad de los nanotubos de carbono son su longitud, su diámetro, su pureza, el método de producción y la funcionalización superficial de los mismos (Madani *et al.*, 2013), por tanto, manipulando estos factores se

podría hacer los MWCNTs más seguros para su uso en Nanomedicina. En la resolución de este problema se centra el siguiente objetivo de la presente tesis doctoral.

Para evitar la bioacumulación de los MWCNTs tras la terapia y el correspondiente daño causado a los tejidos, es necesario llevar a cabo una mejora de su biodegradación. Esto no es una tarea trivial, puesto que se trata de uno de los nanomateriales más estables que existen desde el punto de vista químico y estructural. Sin embargo, el descubrimiento de la biodegradación de los nanotubos de carbono *in vitro* mediante células fagocíticas ha abierto nuevas oportunidades en este problema. Estas células pueden degradar todo tipo de biomoléculas que entran a la célula por las vías endocíticas o fagocíticas. Sus lisosomas, además de mostrar un pH ácido de 4.5, contienen una gran variedad de enzimas que pueden ayudar a digerir los nanotubos de forma gradual (Kagan *et al.*, 2010). Así por ejemplo, los neutrófilos matan a los microorganismos invasores mediante el uso de enzimas generadoras de agentes oxidantes como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), la mieloperoxidasa y las proteasas (Hampton *et al.*, 1998). La mieloperoxidasa humana (hMPO) genera potentes radicales intermedios muy reactivos, y ácido hipocloroso (HOCl), lo que probablemente contribuya a la degradación de materiales poliméricos tales como los implantes de poliuretano (Sutherland *et al.*, 1993). Estos mismos agentes oxidantes (hMPO) también son capaces de biodegradar grafeno (Kurapati *et al.*, 2018).

Se ha observado que los macrófagos (Elgrabli *et al.*, 2015a), (Kagan *et al.*, 2014), las microglías (Russier *et al.*, 2017), los neutrófilos (Vlasova *et al.*, 2012) y los eosinófilos (Andón *et al.*, 2013) degradan los nanotubos de carbono en cultivo después de diferentes tratamientos superficiales previos. Nuestro objetivo es estudiar como se ve afectada la degradación intracelular de los MWCNTs mediante enzimas biológicas al someterlos a distintos grados de oxidación química. Este tratamiento previo da como resultado la formación de diferentes grupos funcionales y defectos estructurales en la superficie del nanotubo que actuarán como sitios activos donde las enzimas pueden atacar con mayor facilidad, facilitando así la degradación en el interior de los macrófagos. Se han explorado varios pretratamientos de oxidación superficial con la finalidad de determinar cuál de ellos es el que consigue un mejor equilibrio en la degradación de los MWCNTs por los macrófagos por un lado y la preservación de sus propiedades biomiméticas con los microtúbulos por otro, haciéndolos biodegradables a la vez que sigan manteniendo su efecto citotóxico y antitumoral.

4.2.1. Pre-tratamiento oxidativo de los MWCNTs.

4.2.1.1. Reacción de oxidación.

Con el objetivo de facilitar la degradación intracelular, se oxidaron p-MWCNTs mediante exposición a una mezcla de ácidos $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ en proporciones de volumen $v/v = 3/1$ a 37°C durante dos tiempos diferentes (2 y 9 h) siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo III, sección 3.1.1.1. Durante este proceso se crean determinados grupos funcionales en la superficie de los p-MWCNTs, tales como hidroxilos ($-\text{C}-\text{OH}$), carbonilos ($-\text{C}=\text{O}$) y carboxilos ($-\text{COOH}$) (Syrgiannis *et al.*, 2014). Normalmente, el proceso de oxidación tiene lugar en primer lugar sobre los posibles defectos ya existentes en las paredes de los p-MWCNTs, generando estos grupos funcionales principalmente en los extremos y a continuación, el ataque con estos ácidos fuertes genera nuevos defectos sobre las paredes laterales del nanotubo.

El mecanismo por el que se lleva a cabo la reacción de oxidación consiste en un ataque electrofílico a los dobles enlaces de los anillos de grafeno por parte de determinadas especies generadas mediante la reacción entre ambos ácidos (por ejemplo NO_2^+), formándose los grupos $-\text{OH}$, posteriormente estos grupos pueden ser oxidados hasta grupos carbonilos y carboxilos (Zhang *et al.*, 2003).

4.2.1.2. Caracterización de la funcionalización química.

i) Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

Se han empleado diferentes técnicas para caracterizar el grado de funcionalización de estos nanotubos sometidos a tratamientos de oxidación (o-MWCNTs). La microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) permitir obtener una visualización directa del diámetro, la longitud y los defectos en la superficie de los nanotubos (Zhang *et al.*, 2003). Por ello, se ha utilizado esta técnica para caracterizar cualitativamente la oxidación, pudiendo observar en las imágenes de alta resolución cómo las superficies de los nanotubos de carbono oxidados durante 9 h presentan diferencias en sus estructuras con respecto a las de los p-MWCNTs (Figura 4.23).

Entre las diferencias más significativas que se observan se puede mencionar una reducción en el número de paredes, de 12-16 capas en los prístinos a 8-10 en los oxidados. También se observan pequeñas imperfecciones superficiales y roturas en las paredes externas (flechas rojas). A pesar de estas modificaciones, se puede apreciar una buena conservación de la estructura general del nanotubo (Figura 4.23). La conservación de dicha estructura es importante para que no pierdan su capacidad intrínseca de interacción biomimética con los microtúbulos, la cual se basa en las similitudes estructurales entre los nanotubos y los protofilamentos que conforman los microtúbulos. La presencia de los pequeños defectos observados no parece relevante a tenor de los resultados, en dicha interacción.

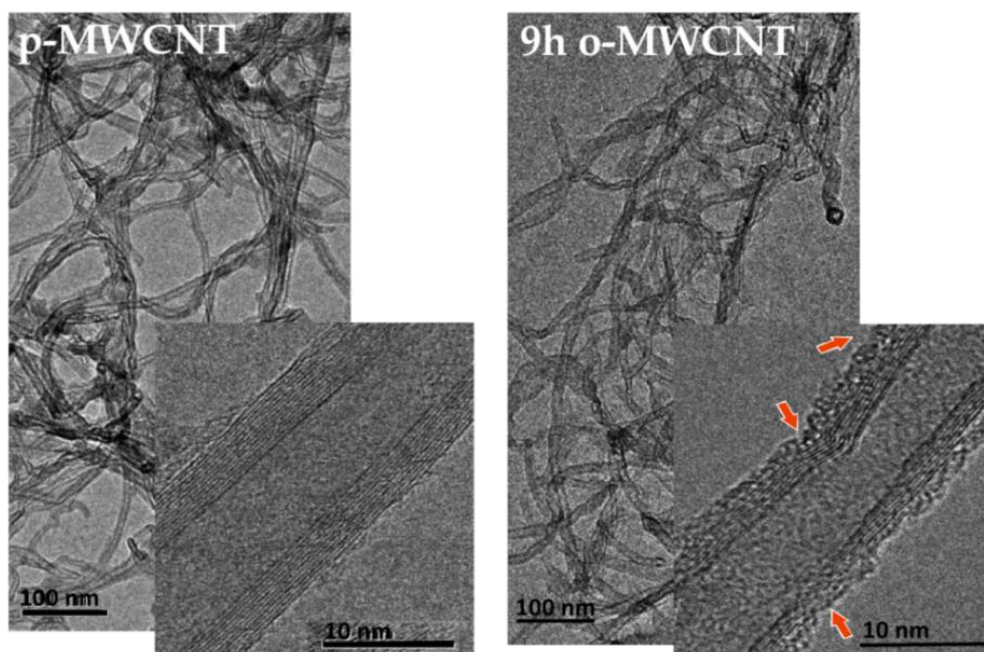


Figura 4.23. Caracterización de la oxidación de MWCNTs mediante HRTEM. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los p-MWCNTs y 9h o-MWCNTs a baja y alta resolución. Las flechas rojas indican defectos y roturas en las paredes externas de los 9h o-MWCNTs.

ii) Espectroscopía Raman.

La espectroscopía Raman proporciona la *huella dactilar* de las moléculas que pueden ser detectadas mediante esta técnica, pudiendo así identificar su presencia en una mezcla de compuestos o incluso dentro de células y tejidos. Como se explicó en el capítulo III, los MWCNTs tienen un espectro Raman característico que se modifica conforme se ve alterada su estructura electrónica. Así, mediante espectroscopía Raman se puede determinar la cantidad de carbono amorfo, la presencia de desorden en la superficie, o el

grado de funcionalización. En particular, como se explicó en el capítulo III sección 3.1.3.1, el estudio de la relación entre la intensidad integrada (A) de las bandas D y G (A_D/A_G) es una forma de semicuantificar el grado de defectos estructurales en la superficie de los nanotubos (Russier *et al.*, 2017), (Bussy *et al.*, 2016), (Nunes *et al.*, 2012). En la Figura 4.24 se muestran los espectros Raman representativos de las muestras de p-MWCNTs (rojo), 2h o-MWCNTs (negro) y 9h o-MWCNTs (azul). En ellos se pueden observar las bandas D y G características en torno a 1330 cm^{-1} y 1585 cm^{-1} respectivamente, junto con la banda D' que se observa como un hombro de la banda G a 1614 cm^{-1} . En verde se representan los ajustes a funciones lorentzianas para las tres bandas señaladas.

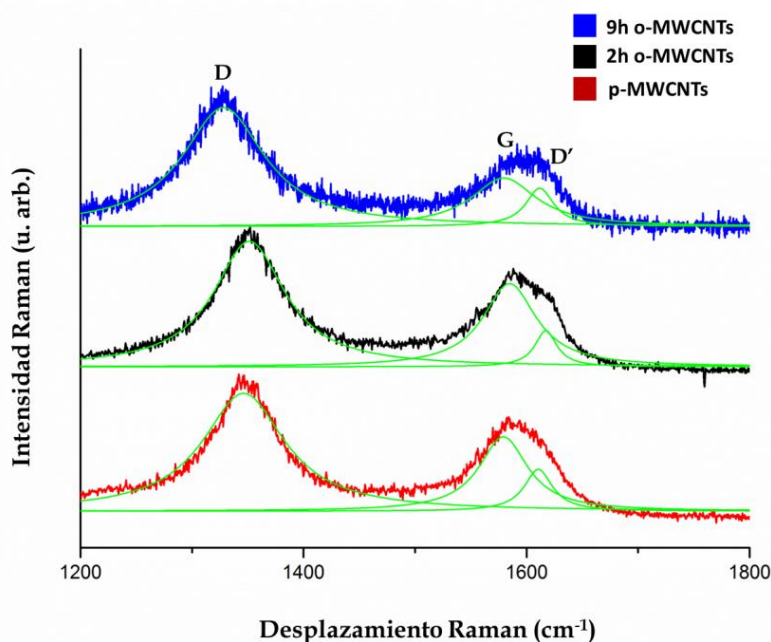


Figura 4.24. Caracterización de la oxidación de MWCNTs mediante espectroscopía Raman. Espectros Raman de p-MWCNTs (rojo), 2h o-MWCNTs (negro), 9h o-MWCNTs (azul). Las bandas características de los MWCNTs aparecen sobre 1330 cm^{-1} (banda D), 1585 cm^{-1} (banda G) y 1614 cm^{-1} (banda D'). En verde se representa el ajuste de las bandas a funciones lorentzianas mediante el cual se han estimado las intensidades integradas.

Se puede observar como la banda G se desplaza hacia menores longitudes de onda conforme aumenta el tiempo de exposición de los p-MWCNTs a los ácidos. Este desplazamiento es debido a la transferencia de carga por parte de los grupos funcionales producidos con el tratamiento de oxidación a la superficie del nanotubo (Gupta *et al.*, 2004).

Basándose en los trabajos mencionados anteriormente, se estudió la relación entre las intensidades integradas, A_D/A_G , para las tres muestras de nanotubos, con el objetivo de verificar el aumento de los defectos superficiales provocados en los nanotubos tras los tratamientos oxidativos. Los resultados obtenidos confirmaron que a medida que aumenta el tiempo de oxidación, el cociente entre las intensidades integradas de ambas bandas también aumenta (Tabla 4.2), validándose así que aumentan los defectos estructurales en la superficie de los MWCNTs con el tiempo de exposición de los mismos a los ácidos.

Tabla 4.2. Análisis de A_D/A_G para p-MWCNTs, 2h y 9h o-MWCNTs.

	p-MWCNTs	2h o-MWCNTs	9h o-MWCNTs
A_D/A_G	2.29	2.32	2.79

iii) Espectroscopía infrarroja.

La siguiente técnica que se utilizó para caracterizar la oxidación de los MWCNTs fue la espectroscopía infrarroja. En la Figura 4.25 se muestran los espectros de absorción en la región IR del espectro electromagnético para las muestras de p-MWCNTs (rojo), 2h o-MWCNTs (negro) y 9h o-MWCNTs (azul). La comparación de los espectros IR de las distintas muestras de nanotubos, demuestra que el tiempo de exposición a los ácidos aumenta las bandas correspondientes a los grupos funcionales producidos por la oxidación. Algunas de estas bandas ya se observan en los p-MWCNTs, los cuales presentan una leve oxidación probablemente producida en el proceso de síntesis, limpieza y purificación.

Para poder comparar las intensidades de las bandas de las diferentes muestras, se normalizaron los espectros IR, obtenidos mediante espesores de las pastillas y concentraciones de MWCNTs en KBr conocidas, como se indicó en el capítulo III, sección 3.1.3.2. Se observa una banda de absorción ancha a 3425 cm^{-1} atribuida a la vibración de estiramiento del -O-H, la banda a 1565 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento del doble enlace C=C y, por otro lado, la banda a 1190 cm^{-1} se atribuye al correspondiente estiramiento del enlace -C-O. El análisis IR también muestra bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento antisimétricas y simétricas de los enlaces -C-H y -CH₂ a 2930 y 2850 cm^{-1} . Las bandas a 1722 y 1640 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de los grupos funcionales -C=O y -COOH (Silverstein *et al.*, 1981). Los modos de flexión del enlace -C-H

fuera del plano en los compuestos aromáticos sustituidos aparecen con un máximo en 800 y 740 cm^{-1} . Por último, la banda que aparece sobre 500 cm^{-1} podría atribuirse a los grupos inorgánicos presentes debido a la contaminación del H_2SO_4 tras el tratamiento de oxidación (Rubinson, 2001). Estas bandas son significativamente más intensas en los 9h o-MWCNTs que en los 2h o-MWCNTs y estos segundos, más intensas que los p-MWCNTs, con lo que se valida también mediante esta técnica la efectividad del tratamiento aplicado.

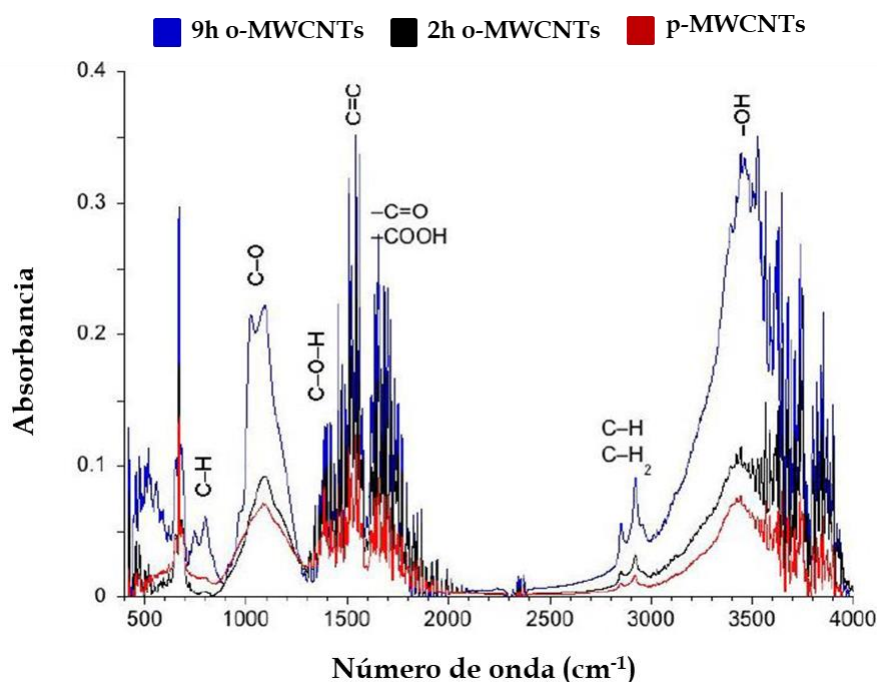


Figura 4.25. Caracterización de la oxidación de MWCNTs mediante espectroscopía FTIR. Espectros de absorción FTIR de p-MWCNTs (rojo), 2h o-MWCNTs (negro) y 9h o-MWCNTs (azul). Las concentraciones de MWCNTs fueron de 2400 μg , 2400 μg y 1576 μg por gramo de KBr para p-MWCNTs, 2h y 9h o-MWCNTs y un espesor de pastilla de 350 μm , 280 μm y 280 μm , respectivamente. Posteriormente estos espectros se escalaron en función del espesor y la concentración de cada muestra para poder compararlos. Se observa que las bandas características de los grupos funcionales originados durante el proceso de oxidación aumentan su intensidad conforme aumenta la exposición de los MWCNTs a los ácidos.

iv) Análisis termogravimétrico.

La presencia de los grupos originados en el proceso oxidativo de los p-MWCNTs se corroboró también mediante TGA, con un espectrómetro de masas acoplado, a través del cual se pudo detectar la liberación CO_2 cuando la muestra se calentó por encima de los 25 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de N_2 (Figura 4.26).

El TGA también sirvió para determinar cuantitativamente el grado de funcionalización de los MWCNTs oxidados durante 9 h. Dicho análisis se llevó a cabo en

atmósfera inerte de N_2 , donde los p-MWCNTs (rojo) no se degradan debido a que no se produce la combustión. La pérdida de masa que se observa en los o-MWCNTs (azul) es debida a la descomposición de los grupos funcionales formados durante el proceso de oxidación. En total se determinó que el 15.11 % de la masa de la muestra de o-MWCNTs se corresponde con dichos grupos funcionales. Esta pérdida de masa se siguió mediante espectrometría de masas, detectando la señal del CO_2 ($m/z=44$), observándose que efectivamente se libera CO_2 proveniente de grupos carboxilos y carbonilos conforme aumenta la temperatura y en una mayor intensidad que la señal observada en los p-MWCNTs (Figura 4.26).

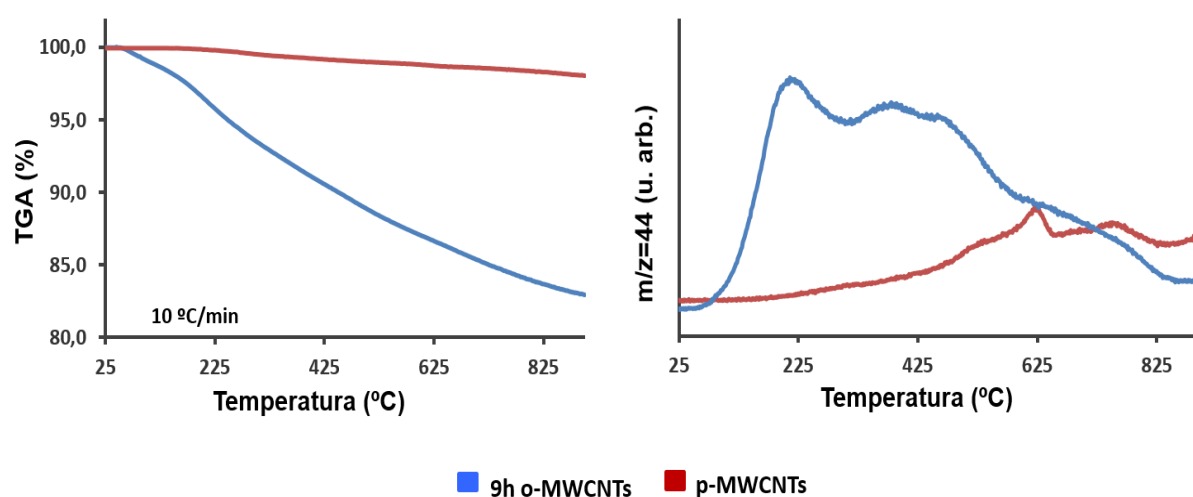


Figura 4.26. Caracterización de la oxidación de MWCNTs mediante análisis termogravimétrico (TGA) y espectrometría de masas. (Arriba) Análisis termogravimétrico de p-MWCNTs (rojo) y 9h o-MWCNTs (azul) en atmósfera de N_2 . Se observa el porcentaje de pérdida de masa conforme aumenta la temperatura, para una rampa de temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de N_2 . El 15.11 % de la masa de o-MWCNTs se corresponde con la masa de los grupos funcionales procedentes de la oxidación. (Abajo) Espectrometría de masas correspondiente a la señal del CO_2 ($m/z=44$) con el aumento de temperatura para la muestra de p-MWCNTs (rojo) y o-MWCNTs (azul) en atmósfera de N_2 .

4.2.2. Los pre-tratamientos oxidativos mejoran la degradación intracelular de los MWCNTs en macrófagos.

Una vez que los MWCNTs cumplen su función biológica como nanotransportadores y agentes antitumorales, deberían ser degradados por los macrófagos asociados al tumor. Como se mencionó anteriormente, muchos trabajos científicos muestran como las células fagocíticas son capaces de degradar los NTCs (Elgrabli *et al.*, 2015), (Russier *et al.*, 2017),

(Kagan *et al.*, 2010), (Vlasova *et al.*, 2012), (Andón *et al.*, 2013). Elgrabli *et al.* describen en su trabajo el camino biológico que conduce a su degradación en el interior de los macrófagos (Elgrabli *et al.*, 2015). En dicho trabajo destacan el papel crucial de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Intracelularmente, los MWCNTs se degradan principalmente en los fagosomas (Elgrabli *et al.*, 2008). La enzima NADPH oxidasa (NOX), consiste en una asociación de glicoproteínas y proteínas citosólicas que están asociados con el plasma y las membranas fagosomales, y están involucrados en variedad de procesos fisiológicos, entre ellos la defensa del organismo de los agentes extraños (Guichard *et al.*, 2006a). Está formada por un componente de membrana y otro citosólico. El componente de membrana está constituido a su vez por dos subunidades p22phox y gp91phox (NOX2) y representa la parte catalítica del complejo enzimático. El componente citosólico está formado por tres subunidades citosólicas, p40phox, p47phox, p67phox, las cuales intervienen en la regulación de la actividad del complejo catalítico (Coyoy-Salgado & Morán, 2012). Este complejo enzimático es la principal fuente de generación de ROS en los fagocitos, encargándose de catalizar la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD^+ o NADP^+ , dando lugar por tanto a la reducción de oxígeno molecular generando la especie radicalaria $\text{O}_2^{\bullet-}$ que puede dismutar a H_2O_2 en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Guichard *et al.*, 2006b). A su vez $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 pueden reaccionar entre sí en presencia del hierro endógeno intracelular, produciendo el radical $\text{OH}^{\bullet}$, el cual es un importante electrófilo que atacará a la nanoestructura gráfica del nanotubo produciendo su degradación.

La presencia en la célula de MWCNTs induce la activación de los complejos de NOX, y como consecuencia su degradación. El mecanismo descrito por Elgrabli *et al.* por el que tiene lugar este proceso consta de dos pasos, por un lado se crean perforaciones en las paredes de los nanotubos que suponen defectos estructurales activos, a partir de los cuales se sigue favoreciendo la degradación. Por otro lado, observan un adelgazamiento continuo del diámetro externo y un aumento del diámetro interno del nanotubo debido a que se van erosionando las capas que lo forman, esto indica que las especies también actúan desde dentro del nanotubo (Elgrabli *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores, se ha estudiado la degradación intracelular en macrófagos de ratón de la línea J774. En la Figura 4.27 se presentan imágenes de contraste de fase y microscopía confocal de fluorescencia de los macrófagos expuestos a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 2h y 9h o-MWCNTs. Como se observa en la imagen de contraste

de fase (Figura 4.27B), los macrófagos expuestos durante 72 h a 9h o-MWCNTs mostraron una reducción significativa de las masas negras intracelulares de nanotubos con respecto a las mismas células expuestas a la misma concentración de 2h o-MWCNTs durante el mismo tiempo. Esto parece indicar que los pre-tratamientos oxidativos más fuertes a los que han sido sometido los 9h o-MWCNTs están ayudando a su degradación intracelular.

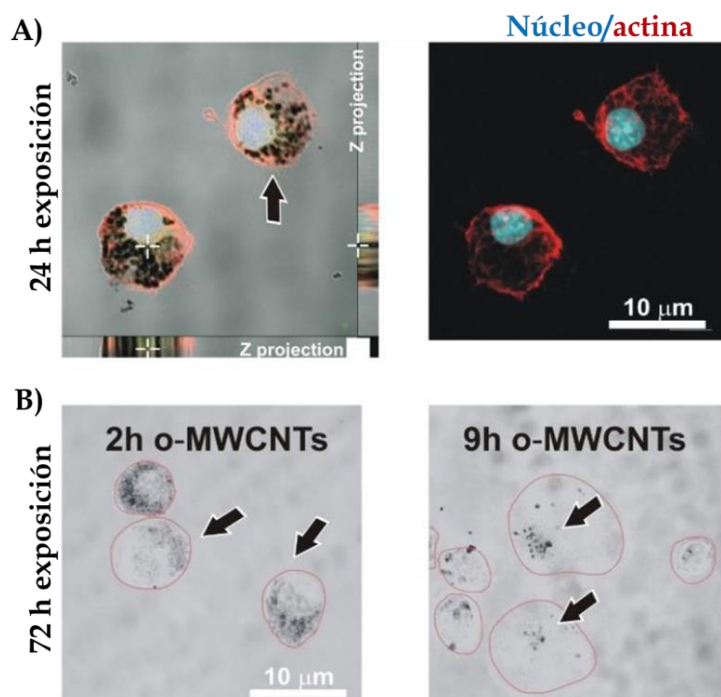


Figura 4.27. o-MWCNTs en el interior de macrófagos. **A)** Proyección en el eje Z de imágenes de contraste de fase/fluorescencia de macrófagos expuestos durante 24 h a 5 µg/mL de 2h o-MWCNTs. En rojo se observa la actina y en azul el ADN nuclear. Las cruces blancas en los laterales de las imágenes muestran la proyección Z en la que se observan masas de carbono intracelulares. **B)** Macrófagos expuestos a 5 µg/mL de 2h y 9h o-MWCNTs. El contorno celular ha sido resaltado mediante una línea roja. Las flechas negras indican agregados de carbono intracelular que se extienden por el citoplasma de los macrófagos. Se observa como las masas de carbono correspondientes a los 9h o-MWCNTs son menores que las de 2h o-MWCNTs.

El proceso de degradación celular que parece observarse en la Figura 4.27, se verificó utilizando espectroscopía Raman (Figura 4.28), focalizando el láser sobre los agregados de carbono que se observa en el interior del citoplasma del macrófago (cruz blanca, Figura 4.27A). Se midió la degradación mediante la determinación de los cocientes entre las áreas integradas A_D/A_G de los espectros Raman de p-MWCNTs y 9h o-MWCNTs expuestos a los macrófagos durante diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 h). Se obtuvieron los espectros Raman para cada muestra en un total de entre 10-20 puntos intracelulares elegidos aleatoriamente en el área de la célula. En la Figura 4.28 se

muestra un espectro Raman representativo para cada tiempo para los 9h o-MWCNTs intracelulares, junto con el análisis estadístico de la relación entre las medias de las 10-20 intensidades integradas medidas para cada muestra tanto de los p-MWCNTs como de los 9h o-MWCNTs. Se muestra también el ajuste a lorentzianas que se llevó a cabo para determinar la intensidad integrada de las bandas D y G. En este caso, el espectro se ajustó a cinco bandas en lugar de tres para deconvolucionar la señal procedente de grupos orgánicos intracelulares.

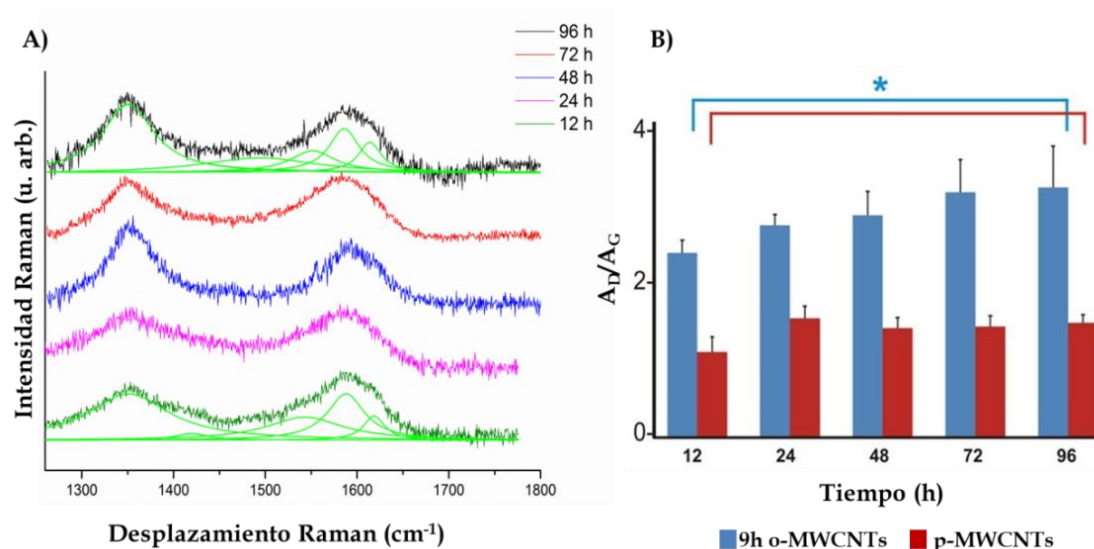


Figura 4.28. Análisis de la degradación intracelular mediante espectroscopía Raman. A) Espectros Raman representativos usados en la semi-cuantificación de la degradación intracelular de los 9h o-MWCNTs en macrófagos para cada tiempo de exposición a los cultivos celulares. En verde se representan los ajustes a lorentzianas realizados para determinar las intensidades integradas de cada banda. B) Semi-cuantificación de la degradación de los p-MWCNTs (rojo) y 9h o-MWCNTs (azul) mediante la medida del cociente A_D/A_G . (9h o-MWCNTs: $t=1.86$, $n=28$, $*=t_{.95}$; p-MWCNTs $t=1.84$, $n=22$).

Los resultados de la Figura 4.28 muestran como hay diferencias significativas en el aumento de la degradación intracelular en el caso de los 9h o-MWCNTs tras 96 h de exposición a los macrófagos. Estas diferencias no se observan sin embargo para los p-MWCNTs. Este hecho demuestra que la degradación intracelular se ve facilitada por el pre-tratamiento oxidativo, mediante el cual se han creado defectos estructurales en la superficie de los nanotubos que ayudan a que se siga dando la degradación.

El proceso de degradación se verificó mediante otro método alternativo. Los p-MWCNTs y 9h o-MWCNTs expuestos a los macrófagos durante 96 h se extrajeron del interior de las células siguiendo el método descrito en el capítulo III, sección 3.2.2. Los nanotubos intracelulares se compararon con los nanotubos presentes en el medio de

cultivo (que no habían sido fagocitados por los macrófagos), y con los nanotubos originales (cuya caracterización se muestra en las Figuras 4.23-26). Para esta comparación, se analizaron las muestras mediante TEM (Figura 4.29) midiéndose las longitudes de alrededor de treinta nanotubos para cada muestra. El análisis estadístico mostró que había importantes diferencias en estas longitudes de tal forma que los 9h o-MWCNTs extraídos del interior de las células eran significativamente más cortos que los que no habían entrado en las células y fueron rescatados del medio de cultivo y que el material original sometido a pre-tratamiento oxidativo extracelular. Estas diferencias sin embargo no se observaron para los p-MWCNTs (Figura 4.29).

Los resultados obtenidos mediante las mediciones hechas en las imágenes de TEM de las longitudes de los diferentes tipos de nanotubos demuestran de nuevo que el pre-tratamiento oxidativo ayuda a la degradación intracelular de los nanotubos.

Paradójicamente, los fagocitos son más susceptibles que otras células a la toxicidad de los NTCs, al menos *in vitro* (Villegas *et al.*, 2014; García-Hevia *et al.*, 2015b). Su gran avidez por capturar estos materiales resulta a menudo en la producción de niveles intolerables de superóxidos y radicales hidroxilos (ROS), implicados en la reacción de estrés oxidativo desencadenada durante la degradación de los NTCs (Lee *et al.*, 2012), (Elgrabli *et al.*, 2015), (Hou *et al.*, 2016), (Kagan *et al.*, 2014).

Para evaluar la toxicidad en macrófagos incubados con nanotubos, se expusieron dichas células a 5 µg/mL de p-MWCNTs, 2h y 9h o-MWCNTs durante diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) y se llevó a cabo un ensayo de viabilidad mediante tinción de las células necróticas con azul de tripan (ver capítulo III, sección 3.2.3). De este estudio se concluye que la pre-oxidación de los nanotubos los hace menos tóxicos en macrófagos, mejorando las tasas de supervivencias de estos fagocitos (Figura 4.30).

Como se observa en la Figura 4.30, hay diferencias significativas entre la viabilidad de los macrófagos tratados con los o-MWCNTs y los tratados con p-MWCNTs, mejorando su supervivencia gracias al pre-tratamiento oxidativo. Por otro lado, las diferencias en la toxicidad producida por los 2h o-MWCNTs y los 9h o-MWCNTs en macrófagos no son significativas, así se decidió escoger los 9h o-MWCNTs para llevar a cabo el resto de los estudios, puesto que presentan un mayor número de defectos superficiales como se ha demostrado en el apartado 4.1.2.1 y, por tanto, serán más fácilmente degradados en el interior de las células.

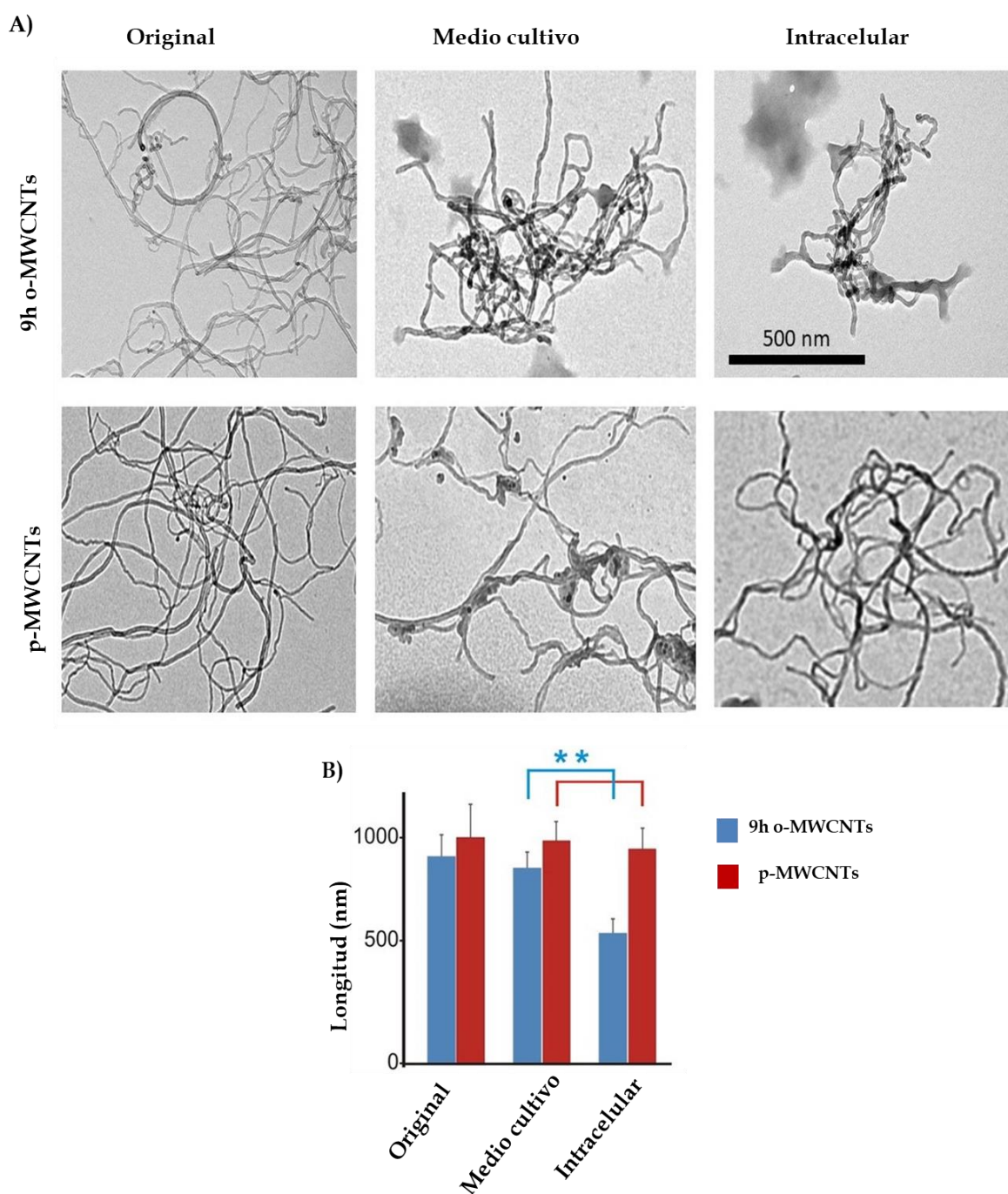


Figura 4.29. Análisis de la degradación intracelular mediante TEM. A) Imágenes TEM de lo p-MWCNTs y 9h o-MWCNTs originales, los presentes en el medio de cultivo y los extraídos de los macrófagos tras 96 h de incubación. Todas las imágenes tienen la misma escala. B) Cuantificación de la longitud media de los diferentes tipos de nanotubos mostrados en A). 9h o-MWCNTs intracelulares muestran una disminución significativa de su longitud con respecto a los del medio de cultivo o a los originales pre-oxidados ($t=2.98$, $n=59$, $**=t_{.995}$). Por el contrario, no se observan diferencias en las longitudes en los prístinos tras 96 h de incubación en macrófagos ($t=0.26$, $n=58$, diferencias no significativas).

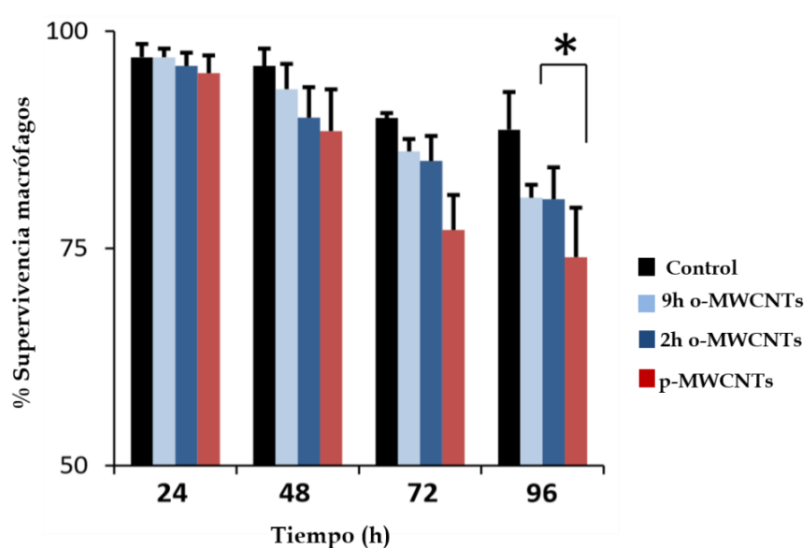


Figura 4.30. Estudio de viabilidad de los macrófagos (J774) expuestos a MWCNTs mediante tinción de las células necróticas con azul de tripán. Se estudió la necrosis producida en los macrófagos incubados con 5 $\mu\text{g/mL}$ de p-MWCNTs (rojo) frente a 2h o-MWCNTs (azul oscuro) y 9h o-MWCNTs (azul claro). En negro se presenta la supervivencia de las células control no tratadas. Se observa que los nanotubos previamente oxidados producen menos necrosis que los prístinos ($t=2.05$, $n=4$, $*=t_{.95}$).

4.2.3. Conservación del efecto citotóxico y antitumoral de los MWCNTs oxidados.

Una vez demostrado que se puede facilitar la degradación de los MWCNTs en el interior de macrófagos sometidos a tratamientos previos de oxidación, es importante comprobar que estos nanotubos biodegradables siguen manteniendo su efecto citotóxico y antitumoral. Para ello, se expusieron cultivos de células HeLa a 50 $\mu\text{g/mL}$ de 9h o-MWCNTs durante 72 h, y se analizaron los efectos producidos en estas células mediante espectroscopía confocal de fluorescencia (Figura 4.31). Entre los efectos citotóxicos observados cabe mencionar i) retracciones citoplasmáticas celulares, ii) compactación del ADN nuclear, y iii) presencia de micronúcleos, todas estas características propias de células necróticas y apoptóticas. Además, también se observaron cambios en el citoesqueleto, como los descritos en la literatura (García-Hevia *et al.*, 2015a), incluyendo un patrón microtubular desorganizado o una reorganización de la red de filamentos de actina.

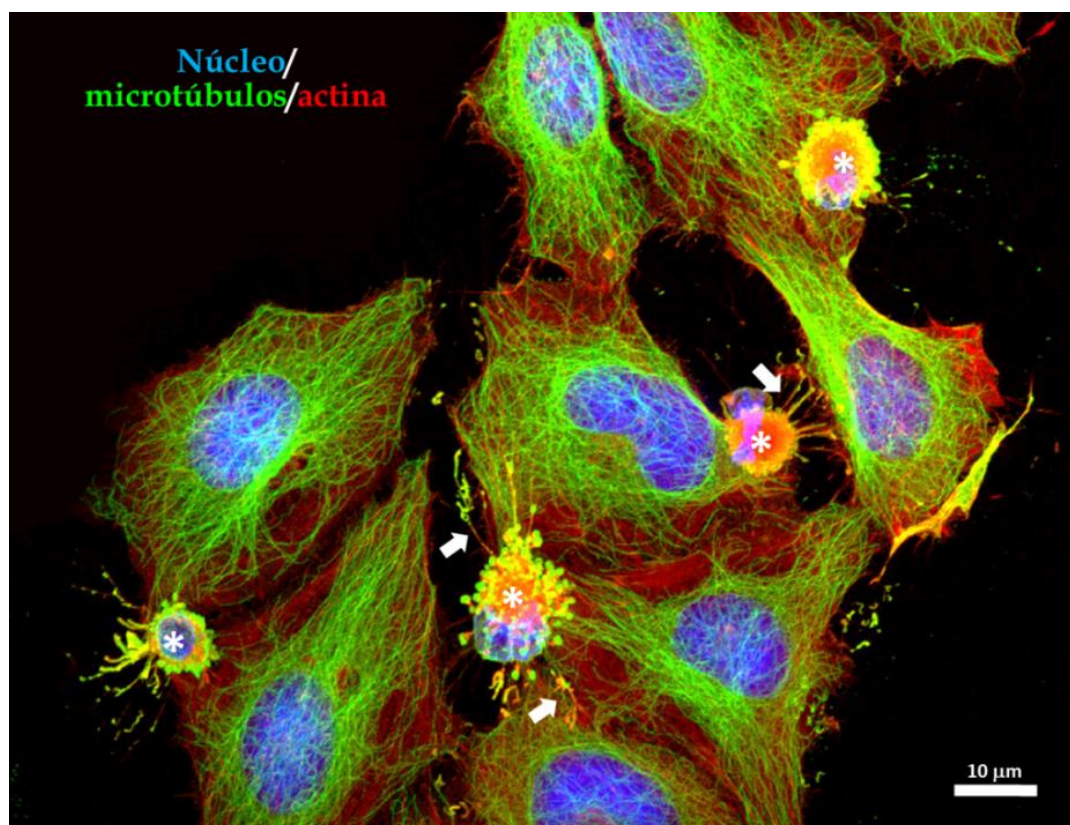


Figura 4.31. Efecto de los 9h o-MWCNTs en cultivo de células HeLa. Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de células HeLa expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de 9h o-MWCNTs durante 72 h. Esta imagen representativa, muestra el efecto apoptótico de los 9h o-MWCNTs *in vitro*. Los asteriscos muestran células muertas con signos indicativos de apoptosis. Las flechas señalan elongaciones anormales de filamentos del citoplasma. En azul se observa el ADN nuclear, en verde los microtúbulos y en rojo la actina.

Es interesante destacar también que muchas células presentaban extensiones citoplasmáticas anormales, fenómeno también descrito en la literatura (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012) y mencionado previamente. Esta observación es más llamativa en el caso de las células apoptóticas (Figura 4.31, asteriscos blancos) las cuales a pesar de presentar retracciones citoplasmáticas, acaban en finas elongaciones (flechas blancas) que se observan tanto por el canal de tubulina como por el de actina.

En la Figura 4.32 se observa una ampliación de una de estas células apoptóticas, demostrando que dichas elongaciones citoplasmáticas anormales están en ambos canales. Esta observación indica la interacción de los 9h o-MWCNTs con ambos protofilamentos intracelulares (tubulina, flecha verde, y actina, flecha roja en la Figura 4.32).

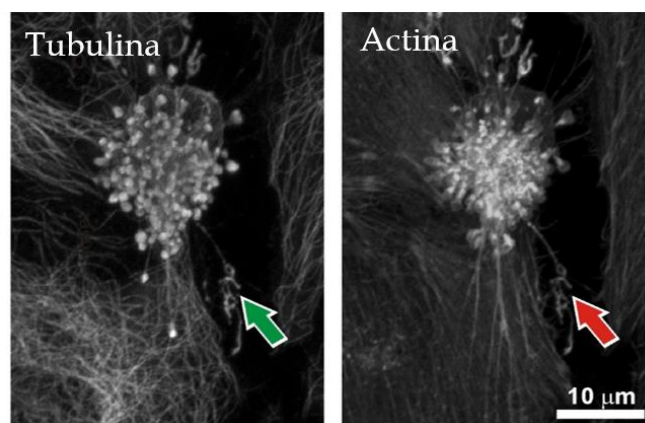


Figura 4.32. Efecto de los 9h o-MWCNTs en cultivo de células HeLa. Imagen de microscopía confocal donde se muestra una célula apoptótica con elongaciones citoplasmáticas anormales aparentemente funcionalizadas con tubulina (flecha verde) y actina (flecha roja) como muestran las tinciones en los canales verde y rojo, respectivamente.

A continuación, se evaluó el efecto antitumoral de los nanotubos de carbono biodegradables (9h o-MWCNTs) en el modelo de tumor sólido producido por células de melanoma maligno de ratón (B16F10), tal y como se describe en el capítulo III, sección 3.3.2. Para llevar a cabo este estudio, los 9h o-MWCNTs funcionalizados con una biocorona de proteínas séricas, y dispersos en medio salino con antibióticos (ver capítulo III), fueron inyectados en el interior de los tumores. Como control se inyectó el medio salino en ratones de la misma camada de los tratados. Para mejorar la reproducibilidad y evitar errores innatos a los experimentos *in vivo*, se inyectó una única dosis de 2 μg de MWCNTs. La inyección intratumoral se llevó a cabo de forma sistemática en más de 150 ratones, los cuales fueron sacrificados 4 días después para poder diseccionar los tumores y evaluar sus pesos. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los p-MWCNTs.

En la Figura 4.33 se puede observar una reducción del 30 % del peso de los tumores tratados con 9h o-MWCNTs con respecto a los controles. Este efecto antitumoral es exactamente el mismo que se produce al inyectar p-MWCNTs.

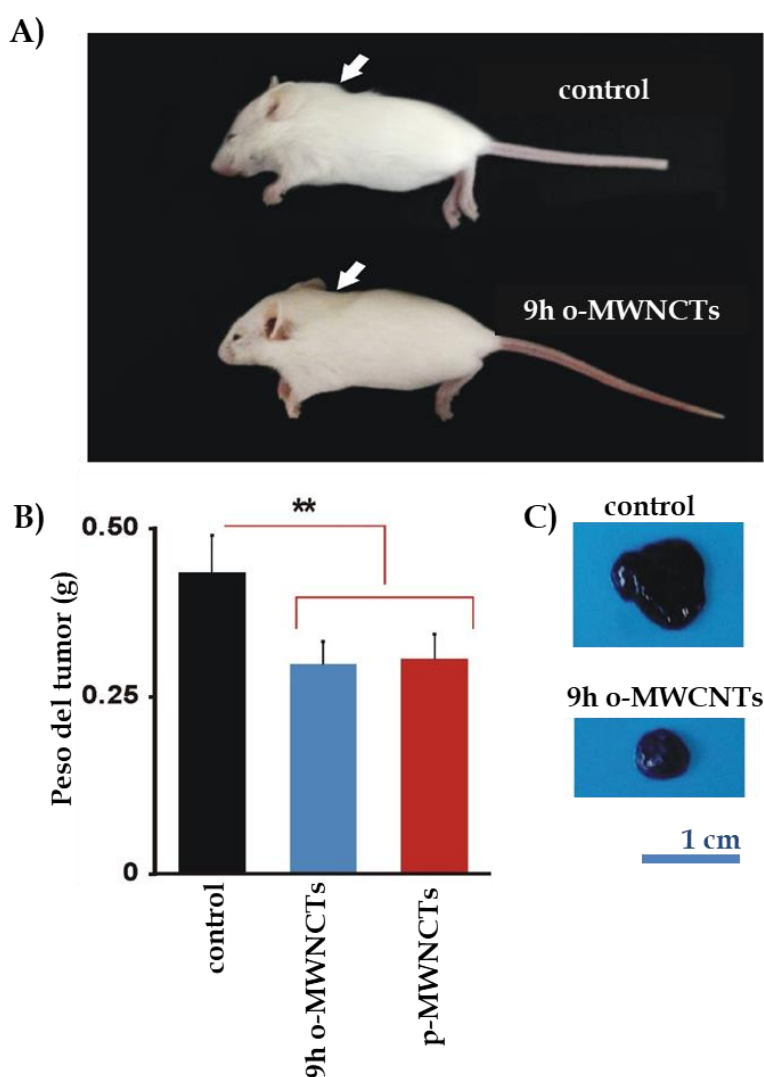


Figura 4.33. Efecto antitumoral de los 9h o-MWCNTs en tumores sólidos de melanoma. **A)** Imágenes de ratones representativos de la misma camada con tumores sólidos de melanoma 96 h después de la inyección de medio salino de resuspensión (control) y de 2 μ g de 9h o-MWCNTs. **B)** Evaluación estadística del tamaño medio tumoral 96 h después de la inyección del tratamiento. 9h o-MWCNTs muestran una disminución significativa del tamaño del tumor con respecto al control (30 %) ($t=1.5$, $n=146$, $*=t_{.90}$). No se observa diferencia de tamaños entre 9h o-MWCNTs y p-MWCNTs ($t=0.2$; $n=161$). **C)** Tumores sólidos de melanoma representativos, arriba se presenta un control tratado únicamente con el medio de inyección, abajo un tumor tratado con una sola inyección de 2 μ g de 9h o-MWCNTs, ambos diseccionados 96 h después de la inyección.

Se puede concluir que se ha conseguido hacer que los MWCNTs se degraden *in vitro* en cultivos de macrófagos, mediante pre-tratamientos oxidativos. Por otro lado, a pesar de los defectos creados en su superficie, estos nanotubos pre-tratados siguen conservando su capacidad antitumoral, consiguiendo una reducción del tamaño de los tumores exactamente igual a la que producen los p-MWCNTs.

4.2.4. Los MWCNTs oxidados se degradan intratumoralmente tras inhibir la progresión del tumor.

Una vez que los MWCNTs han cumplido su función como agentes antitumorales es de especial importancia conocer si tiene lugar su biodegradación intratumoral, ya que su bioacumulación puede llevar a desencadenar efectos secundarios no deseados tales como reacciones inflamatorias, citotoxicidad, aneuploidías o segregación asimétrica de cromosomas, etc., que junto con el aumento en la producción de ROS, puede desembocar en el desarrollo de múltiples enfermedades, como se explicó anteriormente.

Para llevar a cabo el estudio de la degradación intratumoral se utilizó la espectroscopía Raman. En primer lugar, se inyectaron 2 μg de 9h o-MWCNTs y de p-MWCNTs en tumores de ratones de la misma camada. La mitad de estos ratones fueron sacrificados a los 4 días de tratamiento con los nanotubos mientras que la otra mitad se sacrificó a los 15 días. Los nanotubos del interior de los tumores extraídos se analizaron mediante la cuantificación de las intensidades integradas de las bandas D y G de los correspondientes espectros Raman (Figura 4.34).

La cuantificación del cociente A_D/A_G revela un aumento de la degradación al cabo de los 15 días de los 9h o-MWCNTs en el interior de los tumores ($t=1.4$, $n=6$, $*=t_{.90}$) (Figura 4.34). Por otro lado, esta degradación no se observa en el caso de los p-MWCNTs, verificando así los resultados obtenidos *in vitro* en cultivos de macrófagos. Para corroborar la degradación intratumoral, se tomó una muestra de tejido peritumoral, donde ya no hay células neoplásicas pero sí células estromales que sustentan el crecimiento del tumor, y se analizó si aquí tenía lugar también la degradación de los 9h-oMWCNTs, corroborándose un aumento en el cociente A_D/A_G 18 días después de la inyección ($t=1.6$, $n=29$, $*=t_{.90}$) (Figura 4.34).

Por tanto, se puede concluir que los tratamientos previos oxidativos al que se ha sometido a los MWCNTs facilitan su biodegradación en el interior de los tumores tras ejercer su efecto antitumoral. Esta degradación se ve corroborada también en la zona peritumoral donde a pesar de no haber células neoplásicas malignas, se encuentran un gran número de macrófagos, los cuales como muestran diversos trabajos de la literatura son los principales encargados de la degradación de este nanomaterial (Elgrabli *et al.*, 2015), (Kagan *et al.*, 2014).

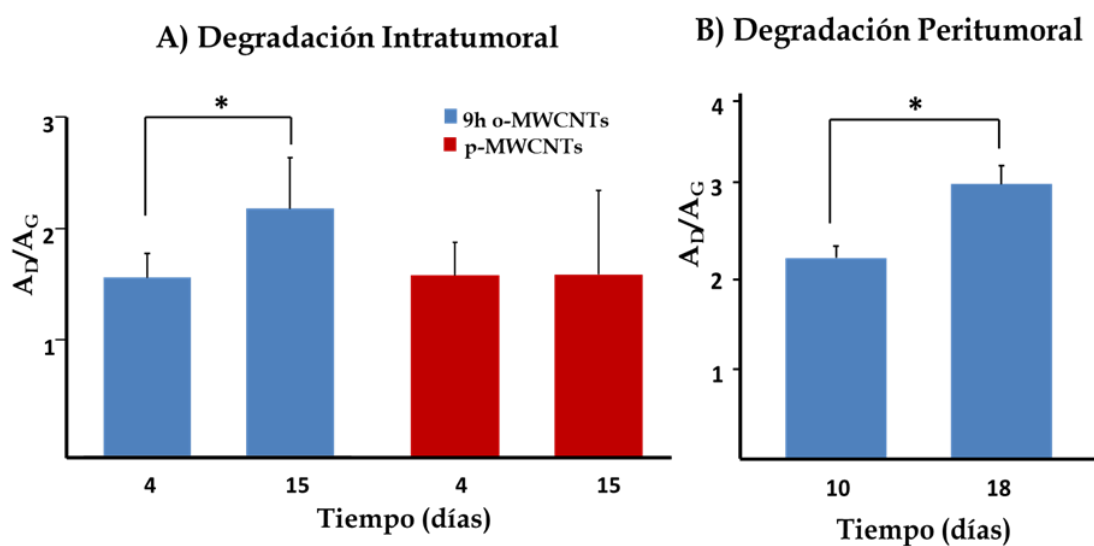


Figura 4.34. Análisis de la degradación de los 9h o-MWCNTs en el órgano tumoral y sus proximidades mediante espectroscopía Raman. A) Semi-cuantificación de los cocientes A_D/A_G para 9h o-MWCNTs (azul) y p-MWCNTs (rojo) intratumorales, 4 y 15 días después de la inyección. Se observa un aumento significativo de la degradación para 9h o-MWCNTs ($t=1.4$, $n=6$, $*=t_{.90}$). Estas diferencias no se observaron en el caso de p-MWCNTs ($t=0.01$, $n=5$). B) Semi-cuantificación de los cocientes A_D/A_G para 9h o-MWCNTs que se encuentran en la zona peritumoral. También en este caso se observa un aumento significativo de la degradación, ($t=1.6$, $n=29$, $*=t_{.90}$).

4.2.5. Discusión de los resultados.

En este segundo bloque de resultados, se ha demostrado que sometiendo los MWCNTs a determinados tratamientos químicos, tales como procesos oxidativos, se forman grupos funcionales y defectos en su superficie que los hacen más biocompatibles y biodegradables tanto *in vitro*, en cultivos celulares de macrófagos, como *in vivo* en el interior de órganos tumorales en ratones. Además, se demuestra que a pesar de ser más biodegradables, siguen conservando su efecto citotóxico en células cancerígenas, y su acción antitumoral en melanomas sólidos de ratón. Por otro lado, se observa que los pre-tratamientos oxidativos reducen la toxicidad de los nanotubos *in vitro* en macrófagos de ratón (J774), no observándose en este caso diferencias entre los oxidados durante 9 h y durante 2 h, por ello el resto de estudios se llevó a cabo utilizando 9h o-MWCNTs ya que como se puede observar mediante espectroscopía Raman e IR (Figuras 4.24 y 4.25), presentan un mayor número de defectos en su superficie, lo que ayudará a la degradación intracelular. Por tanto, cuando a partir de este momento se hable de MWCNTs biodegradables, nos estaremos refiriendo a los 9h o-MWCNTs.

De esta forma, esta tesis presenta un método de biocompatibilización, que puede utilizarse para mejorar la relación riesgo-beneficio de los MWCNTs, pudiéndose así aprovechar sus propiedades de interacción con los filamentos intracelulares, y sus consecuentes efectos antitumorales, para aplicarlos como terapias adyuvantes a las terapias tradicionales contra el cáncer, sin que esto suponga un aumento de efectos secundarios no deseados.

Por otro lado, las excelentes propiedades de superficie de los nanotubos de carbono y su capacidad para atravesar todo tipo de barreras celulares, los convierte en buenos candidatos a su uso como nanotransportadores de determinadas terapias, tal y como se estudió en el apartado 4.1 de este capítulo. Sin embargo, la biodegradación de estos nanotransportadores es un factor clave a la hora de pensar en su posible uso clínico, por tanto, los hallazgos mostrados en esta sección, abren una puerta al uso de este nanomaterial para transportar fármacos antineoplásicos de forma específica a las células dianas, degradándose *in situ* en los propios órganos tumorales, gracias a la acción del microambiente tumoral ácido y de las células fagocíticas que forman parte del estroma tumoral.

Por último, como ya se indicó en la sección anterior, estos nanotubos biodegradables, con su capacidad intrínseca antitumoral y transportadora de terapias, pueden utilizarse para recubrir otras estructuras. Estas estructuras, que a su vez pueden encapsular terapias alternativas, se pueden aprovechar de las propiedades de penetración de los nanotubos de carbono, para poder pasar al citoplasma celular, donde una vez ejerzan su función sean degradados y eliminados del organismo. En esta idea se centra el último objetivo de la presente tesis doctoral que se expone a continuación.

4.3. Diseño de un nanodispensador de multiterapias basado en el recubrimiento con MWNCTs biodegradables.

Los mayores desafíos a la hora de llevar a cabo una administración efectiva de fármacos son i) el reconocimiento celular específico del nanodispensador, ii) la protección de la carga de las condiciones químicas hostiles propias de los endolisosomas, iii) el escape endolisosomal no letal, iv) la entrega efectiva de la carga en el citoplasma, y v) la

eliminación del nanotransportador una vez cumplida su función para evitar la bioacumulación y la citotoxicidad a largo plazo (ver capítulo I).

Todos estos objetivos se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar un sistema de transporte de multiterapias para su aplicación en el tratamiento del cáncer, que además también aproveche todas las propiedades de los NTCs biodegradables anteriormente estudiadas.

4.3.1. Síntesis de un nanodispensador basado en un recubrimiento de nanotubos de carbono biodegradable sobre un núcleo de sílice mesoporosa.

El sistema que se plantea se representa en la Figura 4.35. Está formado por un núcleo esférico de SiO_2 MP. Esta partícula puede estar funcionalizada con un fluoróforo que va a permitir el seguimiento de la misma intracelularmente. En el interior de los poros se pueden encapsular una gran variedad de fármacos o moléculas de interés y posteriormente este sistema se puede recubrir mediante una serie de polielectrolitos que actúan como sellado y permite la liberación controlada de la carga que se quiere transportar a las células dianas. Todo este sistema se recubre con MWCNTs que han sido tratados para hacerlos más biodegradables, los cuales a su vez se pueden funcionalizar con otras terapias, y que ayudarán a que las partículas de SiO_2 MP se liberen correctamente al citoplasma. Finalmente, para propiciar la endocitosis mediada por receptores celulares, las partículas se funcionalizaron con una biocorona de proteínas. Este sistema se denotará como SiO_2 -MWCNT.

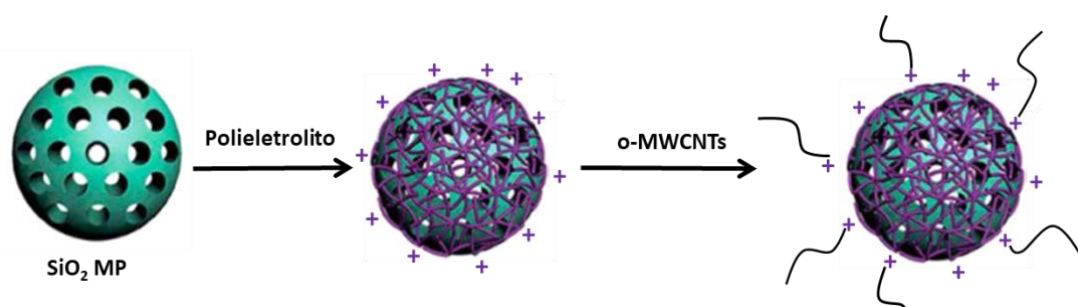


Figura 4.35. Esquema del diseño del dispensador de multi-terapias basado en SiO_2 MP y MWCNTs biodegradables (SiO_2 -MWCNT).

4.3.1.1. Síntesis de SiO₂ MP.

Se eligió la SiO₂ MP como núcleo de esta estructura debido a que tiene una serie de características que lo hacen un buen sistema de entrega de fármacos. Dentro de estas características cabe destacar i) sus propiedades físico-químicas que le proporcionan una estructura mesoporosa con un volumen de poro y un diámetro variable. Se puede controlar el diámetro según las necesidades en un amplio rango, comprendido entre 40 y 600 nm y un volumen de poro también variable que puede estar comprendido entre ~ 0.2 y 1 cm³/g, junto con una elevada área superficial (Qianjun *et al.*, 2009), ii) permiten llevar a cabo una liberación controlada del fármaco (Liu *et al.*, 2015), (Gong *et al.*, 2015), (Baeza *et al.*, 2012), iii) son internalizadas por las células vía endolisosomal (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017), (Oh & Park, 2014), (Hu *et al.*, 2011), iv) son biocompatibles (Slowing *et al.*, 2008), (Huang *et al.*, 2011), (Lu *et al.*, 2010), (Chen *et al.*, 2013), v) son biodegradables (Vallet-Regí *et al.*, 2018), (Chen *et al.*, 2012), (Cauda *et al.*, 2010a), (Cauda *et al.*, 2010b) (ver capítulo I).

Para llevar a cabo la síntesis de estas partículas se siguieron los pasos descritos en la sección 3.1.2.2 del capítulo III. El mecanismo por el que tiene lugar, se basa en la condensación de precursores de sílice en presencia de un surfactante catiónico. Se trata de una adaptación del método descrito por Stöber para la obtención de partículas de sílice sólida (Stöber *et al.*, 1968), con la diferencia de que aquí se incorpora un tensioactivo catiónico para la formación de los poros. Este método permite la obtención de estructuras ordenadas y monodispersas mediante la formación de micelas, que actuarán a modo de molde o plantilla y darán origen a la formación de los poros (Zanella, 2012).

El procedimiento estándar consiste en mezclar el precursor de la sílice (concretamente se utilizó el tetraetilortosilicato (TEOS)), con el surfactante catiónico (bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)), a una temperatura comprendida entre 25 y 95 °C (Qianjun *et al.*, 2009). Las partículas de SiO₂ se forman a través de dos reacciones clave: hidrólisis y condensación (Figura 4.36) (Wu *et al.*, 2013). La primera etapa del proceso consiste en la hidrólisis del alcóxido. En esta etapa se obtiene una suspensión coloidal que contiene partículas de tamaño inferior a 100 nm, a la vez que se forman grupos silanoles (Si-OH) y se libera el alcohol correspondiente (Asefa & Tao, 2012). A continuación, los grupos silanoles polimerizan por condensación, formando estructuras tridimensionales unidas por enlaces siloxanos (Si-O-Si), con eliminación de agua y de una segunda molécula de etanol.

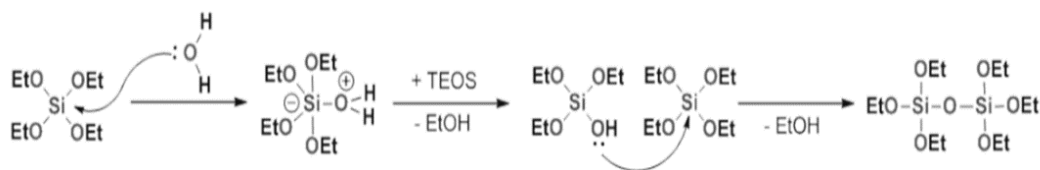


Figura 4.36. Mecanismo de la polimerización del TEOS. Las partículas de SiO_2 se forman a partir del precursor tetraetilortosilicato (TEOS) mediante una reacción de hidrólisis seguida de una condensación (Llinas & Sánchez, 2014).

En esta segunda etapa de condensación se forma un gel, más o menos compacto y denso (Zanella, 2012). La presencia en esta fase de micelas formadas por el surfactante es crítica, ya que actúan a modo de molde y darán origen a la formación de los poros. En efecto, tras la hidrólisis del TEOS, se producen interacciones electrostáticas entre el surfactante catiónico y las cargas negativas del precursor de sílice, formando una mesofase líquido cristalina (Qianjun *et al.*, 2009). Las moléculas de TEOS se disponen alrededor de las micelas formando las partículas de sílice. Estas partículas irán aumentando de tamaño hasta que la carga neta negativa que introducen las especies de sílice es tan elevada que deja de crecer. Finalmente, se libera el surfactante del interior de los poros bien mediante calcinación a 600 °C o mediante un tratamiento más suave con disolventes orgánicos (ver capítulo III, sección 3.1.2.3).

Se llevó a cabo la síntesis de partículas de SiO_2 MP de dos diámetros diferentes, 550 nm (Figura 4.38) y 160 nm (Figura 4.39) aproximadamente, siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo III, sección 3.1.2.2. Una vez sintetizadas y calcinadas, las partículas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como se observa en las Figuras 4.38 y 4.39, hay una dispersión homogénea de los tamaños, con una desviación estándar de la media menor del 10 % en ambos casos.

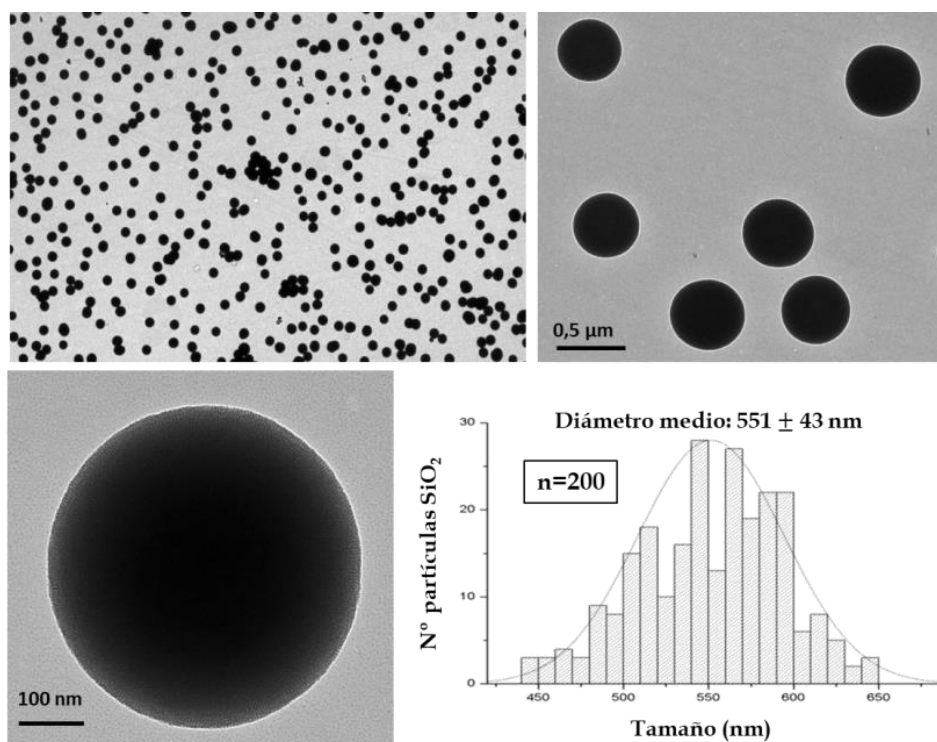


Figura 4.38. Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las partículas de SiO_2 MP de 551 nm . El tamaño medio se determinó mediante la medición del diámetro de 200 partículas con el programa Image Tool. Se obtuvo un valor medio de $551 \pm 43 \text{ nm}$.

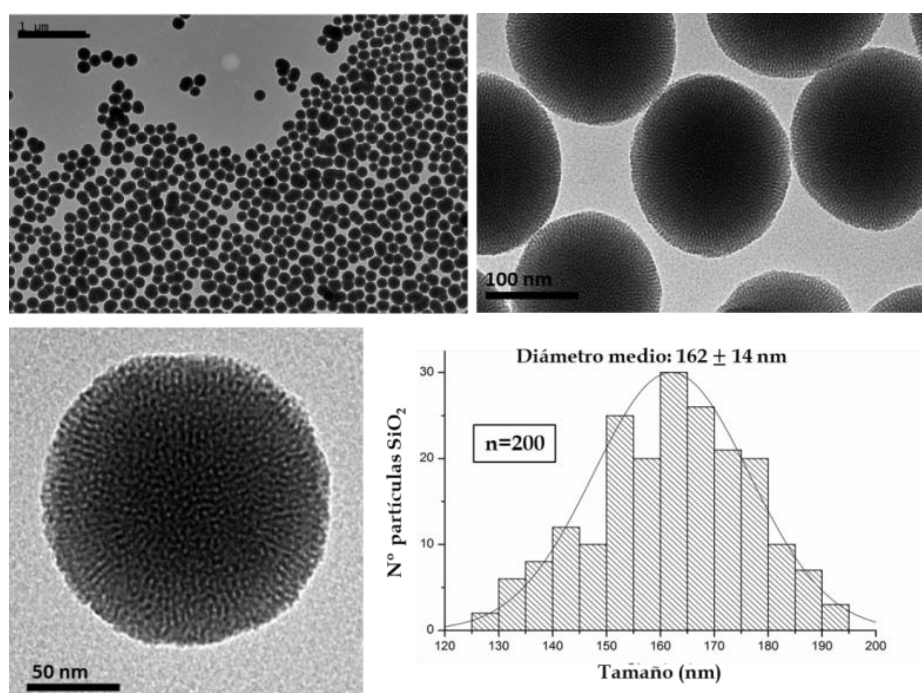


Figura 4.39. Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las partículas de SiO_2 MP de 162 nm . El tamaño medio se determinó mediante la medición del diámetro de 200 partículas con el programa Image Tool. Se obtuvo un valor medio de $162 \pm 14 \text{ nm}$.

4.3.1.2. Recubrimiento con MWCNTs biodegradables.

En la naturaleza, los procesos evolutivos han mejorado el diseño y la funcionalidad de los materiales naturales. Un ejemplo bien conocido es la organización en capas de nácar que se encuentra en las conchas de los animales marinos. Imitando estos sistemas naturales en capas se ha desarrollado un mecanismo para la funcionalización de nanoestructuras (Costa & Mano, 2013). En particular, se llevó a cabo la adsorción de polianiones y policationes mediante interacciones electrostáticas sobre la superficie, con carga negativa, de las partículas de SiO₂ MP. Esta técnica mediante la cual películas delgadas de capas múltiples se pueden construir con precisión nanométrica, fue introducida por primera vez por Decher, Hong y Schmitt y se denomina “*layer-by-layer*” (Decher *et al.*, 1992).

En primer lugar, como prueba de concepto, se llevó a cabo el recubrimiento de la superficie de la SiO₂ MP con tres capas de polielectrolitos, (1-PDDA(+); 2-PSS(-); 3-PDDA(+)), siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo III, sección 3.1.2.5. A estos polielectrolitos se enlazaron los MWCNTs biodegradables, los cuales presentan cargas negativas en su superficie que les permiten interaccionar electrostáticamente con las cargas positivas del PDDA. El resultado obtenido se observó mediante TEM (Figura 4.40).

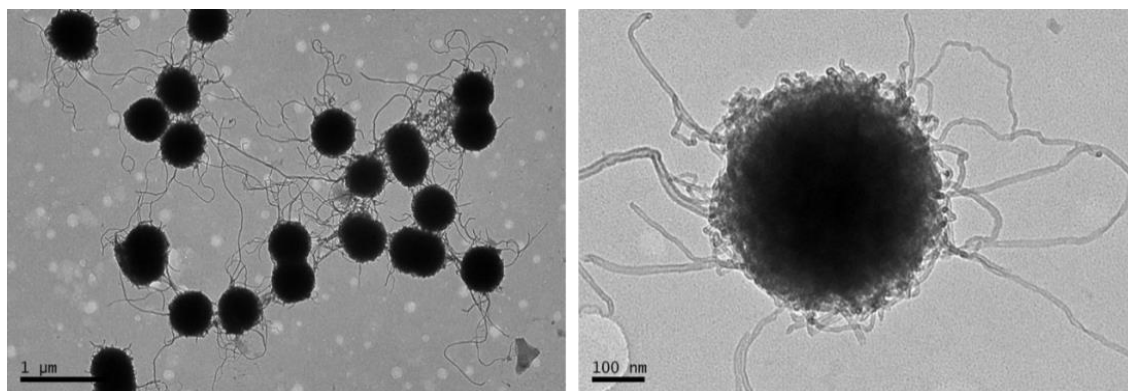


Figura 4.40. Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del sistema SiO₂-MWCNT constituido por las partículas de SiO₂ MP de 551 nm recubiertas con MWCNTs biodegradables.

De forma alternativa se utilizó poly-L-lisina para llevar a cabo el sellado de las partículas de SiO₂ MP siguiendo el procedimiento explicado en la sección 3.1.2.5. del capítulo III. La poly-L-lisina se trata de un homopolímero natural del aminoácido lisina. Se utiliza como conservante de algunos alimentos (Hiraki *et al.*, 2003) y además tiene un efecto antimicrobiano contra levaduras, hongos y bacterias (Hiraki, 2000). Por otro lado,

este polímero tiene una gran afinidad por la superficie celular, de hecho es utilizado para recubrir el material de cultivo resultando en un factor de unión que mejora la adherencia de las células al mismo (Mazia *et al.*, 1975). La poly-L-lisina presenta una alta densidad de carga positiva que le permite formar complejos con moléculas cargadas negativamente (Park *et al.*, 2006). Debido a esta propiedad se han utilizado ampliamente como sistema de suministro de ADN (Kadlecova *et al.*, 2013) y proteínas (Jiang *et al.*, 2016). También se ha demostrado que las partículas basadas en recubrimiento con poly-L-lisina se acumulan de forma pasiva en las zonas de los vasos sanguíneos dañadas por un accidente cerebrovascular, debido a la incorporación en el trombo recién formado (Jiang *et al.*, 2015). Esto ofrece una nueva forma de administrar agentes terapéuticos específicamente en los sitios lesionados después del daño vascular. Por otro lado, la poly-L-lisina, a diferencia de su isómero poly-D-lisina, es un polímero natural y, por tanto, es sensible a la degradación enzimática intracelular, por lo que se puede afirmar que es biodegradable y biocompatible (Hartono *et al.*, 2012).

Por todas las propiedades expuestas anteriormente, se utilizó la poly-L-lisina como sistema de sellado de las partículas de SiO₂ MP. A este polímero cargado positivamente se enlazan los MWCNTs biodegradables. Este sistema se caracterizó mediante TEM (Figura 4.41).

Se puede concluir, que se ha desarrollado un sistema en el cual es posible encapsular determinadas moléculas gracias a la presencia de poros que se pueden sellar con diferentes polielectrolitos. Se eligió finalmente la poly-L-lisina debido a que es biodegradable, biocompatible y a que presenta una gran afinidad por la superficie celular debido a la interacción electrostáticas que se produce entre las cargas negativas allí presentes y sus propias cargas positivas. La presencia de estas cargas también las hace un buen sistema para transportar moléculas con cargas negativas, o en nuestro caso para enlazarse a MWCNTs biodegradables, consiguiendo que estos recubran dichas estructuras de sílice con todas las ventajas que esto supone anteriormente mencionadas.

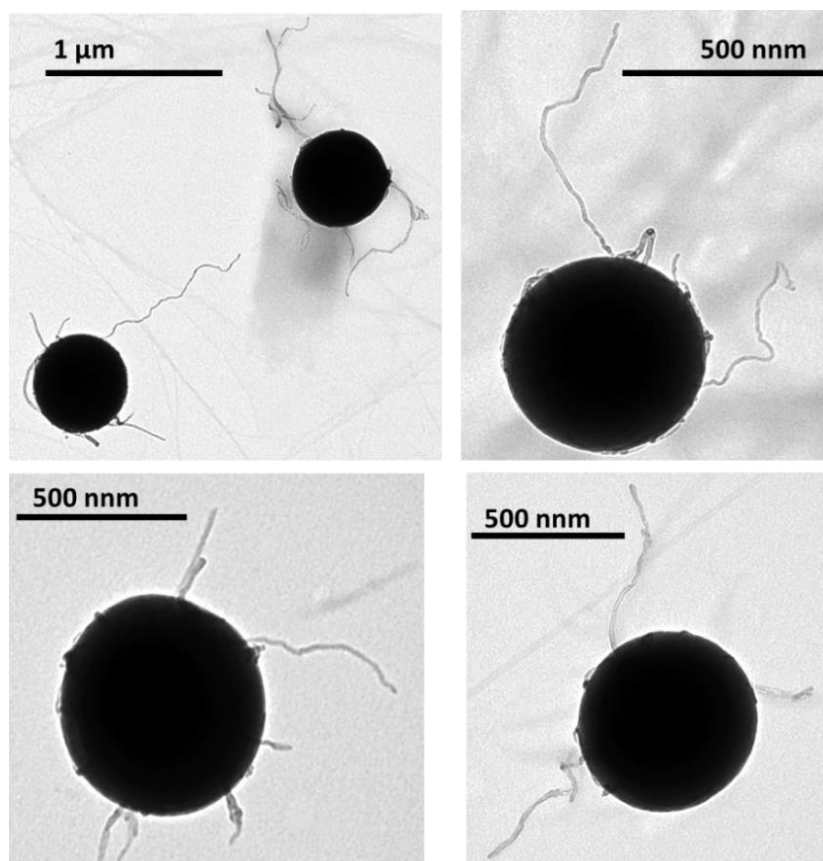


Figura 4.41. Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del sistema SiO₂-MWCNT constituido por las partículas de SiO₂ MP de 551 nm selladas con poly-L-lisina y posteriormente recubiertas con MWCNTs biodegradables.

4.3.2. Liberación endolisosomal del sistema SiO₂-MWCNT.

En un trabajo realizado en nuestros laboratorios conjuntamente con miembros del grupo de investigación Team Nano Tech de la Universidad de Vigo, se llevó a cabo la funcionalización de las partículas de SiO₂ con un fluoróforo, concretamente la Fluoresceína isotiocianato (FITC) para poder seguir las intracelularmente (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017). Posteriormente, esas partículas fluorescentes se recubrieron con nanotubos biodegradables.

Como se explicó anteriormente, la finalidad de este estudio es el diseño de un posible dispensador de multiterapias. En este diseño, los nanotubos participan en el escape endolisosomal de las partículas mediante penetración, perforación, y permeabilización de la membrana endolisosomal, destruyendo finalmente la integridad de este compartimento subcelular y permitiendo la liberación de la partícula al citosol (Figura 4.42).

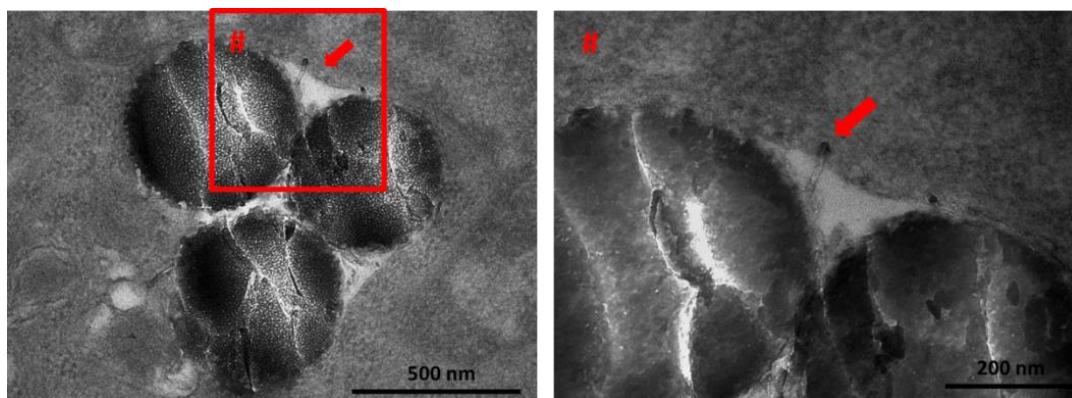


Figura 4.42. Imágenes de Microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan los MWCNTs que recubren las partículas de sílice, perforando la membrana endolisosomal.

Para demostrar esta hipótesis, se llevó a cabo la funcionalización covalente de los MWCNTs biodegradables con un colorante (5-TAMRA) que emite a una longitud de onda con máximo en $\lambda=578$ nm, siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo III, sección 3.1.1.3. Con este experimento se pretende confirmar la eliminación de la biocorona de proteínas de los MWCNTs, la ruptura del enlace disulfuro que une al colorante con la superficie del nanotubo y, finalmente, la permeabilización de la membrana endolisosomal, lo que permitiría la liberación del colorante al citoplasma. A su vez, también se pretende usar como modelo de liberación de una posible terapia que fuera enlazada a los MWCNTs por el mismo tipo de enlace que el caso del 5-TAMRA.

Dicho colorante se unió a la superficie del nanotubo mediante una *linker* que contiene un puente disulfuro (S-S). Este enlace es muy interesante desde el punto de vista celular ya que es muy sensible al medio reductor endolisosomal e incluso al medio citoplasmático. El enlace disulfuro, es un enlace covalente que se forma entre dos grupos tioles (-SH) y se trata de un enlace muy importante en la estructura, plegamiento y función de las proteínas. El grupo -SH del aminoácido cisteína es muy reactivo. La reacción más común es una oxidación reversible con otra molécula de cisteína para dar lugar a un puente disulfuro. En nuestro caso se utilizó como *linker* la cistamina, molécula con un puente disulfuro ya formado (ver capítulo III, Figura 3.2). Este enlace es fácilmente reducido a grupos tioles mediante agentes reductores como por ejemplo el 2-mercaptoetanol, o a través del medio ácido reductor presente en los endolisomas.

Como es característico de los nanotubos de carbono, cuando un fluoróforo se encuentra unido a su superficie, la emisión de fluorescencia desaparece debido a que se

produce un efecto conocido como “*quenching*”, mediante el cual se produce un proceso de transferencia de carga, en el que el electrón excitado del fluoróforo se transfiere al NTC (Chiu *et al.*, 2011). Así en primer lugar, se llevó a cabo un estudio de la ruptura del puente disulfuro *in vitro*, exponiendo los nanotubos funcionalizados con 5-TAMRA a 2-mercaptoetanol, se observó que la intensidad de emisión de fluorescencia del 5-TAMRA pasó de ser nula a ser detectable después de la exposición a condiciones reductoras debido a la ruptura del puente disulfuro y con ello a la separación del colorante de la superficie del nanotubo. Los espectros de fluorescencia que se presentan en la Figura 4.43 han sido obtenidos por el Dr. Miguel Correa Duarte y su grupo de investigación, en la Universidad de Vigo-CIMBIO.

Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo de liberación en el interior de células HeLa. Las condiciones ácido reductoras endolisosómicas permitieron la ruptura de este enlace, pasando así de no observarse emisión del colorante a las 2 h de exposición de las células a los MWCNTs-TAMRA, a detectar la fluorescencia del 5-TAMRA al cabo de 24 h después de la endocitosis (Figura 4.44), observándose emisión del colorante por todo el citoplasma.

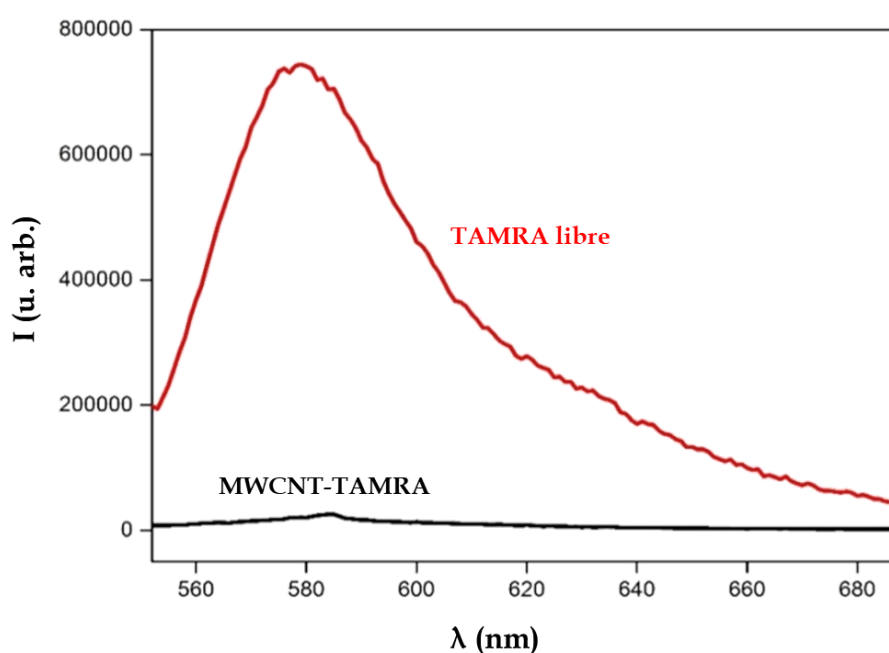


Figura 4.43. Ensayo de liberación del 5-TAMRA *in vitro*. En negro se observa el espectro de emisión de fluorescencia de los MWCNTs con 5-TAMRA enlazado a su superficie. La emisión del colorante es nula debido a que se produce *quenching* como consecuencia de la transferencia de carga cuando está enlazado al nanotubo. En rojo se observa el espectro de emisión de fluorescencia de MWCNTs y TAMRA una vez han sido expuesto al agente reductor 2-mercaptoetanol y el colorante se ha liberado. $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$. Espectros obtenidos por el Dr. Miguel Correa Duarte de la Universidad de Vigo-CIMBIO.

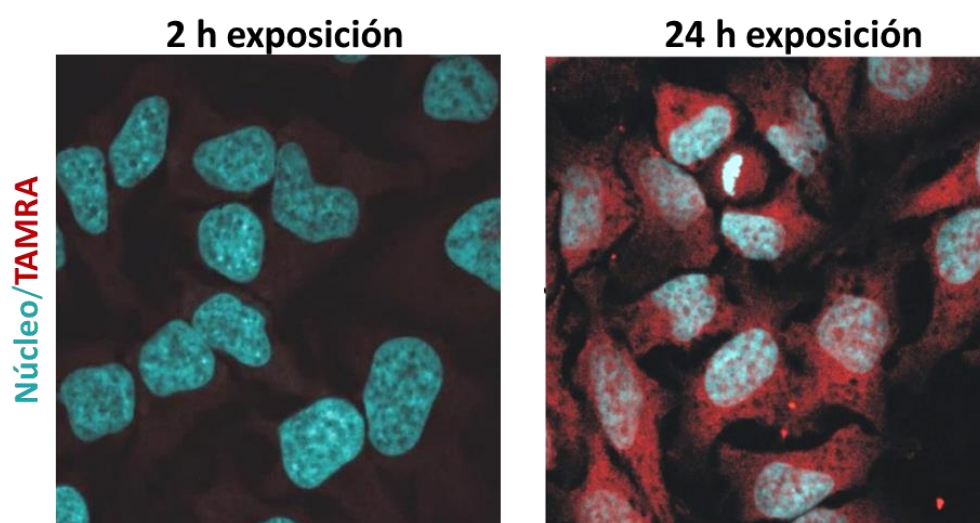


Figura 4.44. Ensayo de liberación del 5-TAMRA en células HeLa expuestas a MWCNTs-TAMRA. En azul se presentan los núcleos celulares. En rojo la emisión a 578 nm (5-TAMRA). A las 2 h de exposición de las células a los MWCNTs-TAMRA no se observa emisión del colorante lo que indica que permanece unido a la superficie de los nanotubos. 24 h después de la endocitosis los citoplasmas celulares se encuentran claramente teñidos.

Por último, las partículas de SiO₂ funcionalizadas con FITC para poder seguir su señal intracelular, se recubrieron con MWCNTs-TAMRA y se estudió la liberación del colorante intracelularmente en cultivos de células HeLa. Aquí se vuelve a corroborar como a las 2 h de exposición no se detecta emisión del colorante, lo que indica que permanece enlazado al nanotubo, mientras que 24 h después de la endocitosis, se observa emisión del 5-TAMRA por todo el citoplasma celular (Figura 4.45).

Estos resultados confirman la degradación de la biocorona proteica que recubre los MWCNTs. La eliminación de esta cubierta proteica cambia las propiedades de superficie de estos nanofilamentos, volviéndose apolares y aumentando su afinidad por las membranas lipídicas endolisosómicas, lo que desencadena su penetración, perforación y permeabilización y finalmente, la liberación de las partículas al citosol. Junto con estas partículas también se liberarían las posibles terapias que transporten, tanto en el interior de los poros, como enlazadas a los MWCNTs.

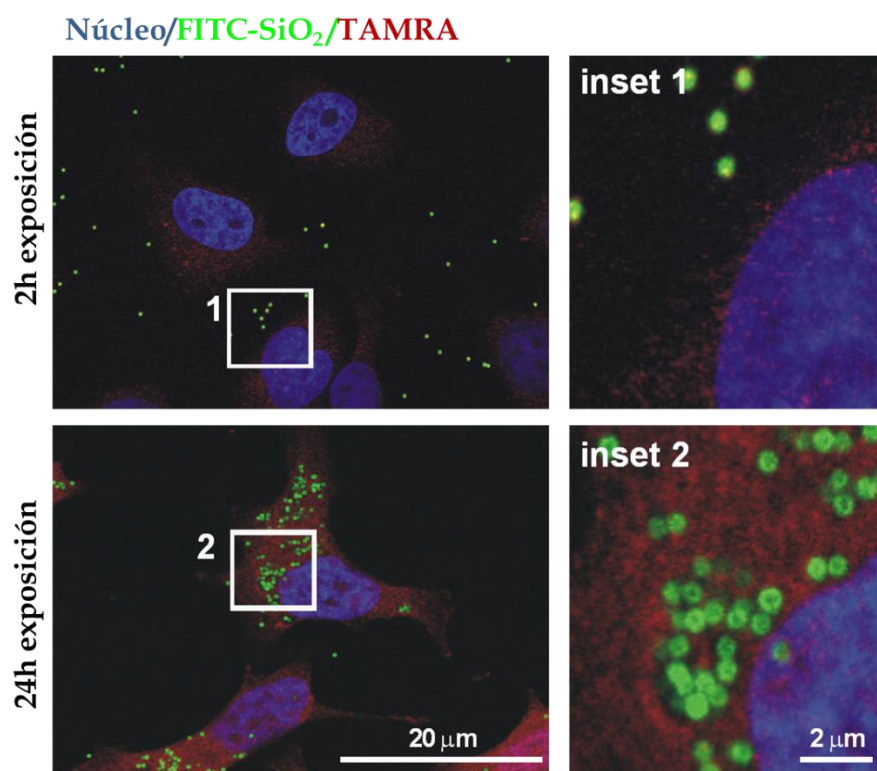


Figura 4.45. Ensayo de liberación del 5-TAMRA en células HeLa expuestas a partículas de SiO₂ recubiertas con MWCNTs-TAMRA. En azul se presentan los núcleos celulares, en verde las partículas de SiO₂ funcionalizadas con FITC, y en rojo la emisión del 5-TAMRA. A las 2 h de exposición no se observa emisión del colorante lo que indica que permanece unido a la superficie de los nanotubos. 24 h después de la endocitosis los citoplasmas celulares se encuentran completamente teñidos por el 5-TAMRA (Iturrioz-Rodríguez et al., 2017).

4.3.3. Discusión de los resultados.

En esta sección se ha desarrollado un nuevo sistema de administración de multiterapias (SiO₂-MWCNT) basado en partículas de SiO₂ MP recubiertas con MWCNTs biodegradables. Se ha descrito como los nanotubos ayudan a escapar a este sistema de entrega de fármacos de los endolisosomas y les permiten liberar las terapias en el citosol, sin afectar la viabilidad de la célula huésped (González-Domínguez et al., 2017). Esta estrategia de invasión citoplásmica basada en el recubrimiento con nanotubos de carbono, que además, como se demostró en la sección anterior, pueden tratarse químicamente para mejorar su biodegradabilidad, es aplicable a una amplia gama de morfologías, tamaños que van desde la escala nanométrica a la micrométrica e incluso geometrías huecas, porosas o sólidas. Por lo tanto, este diseño constituye una herramienta extraordinaria para la posible administración de terapias. Además, el diseño que aquí se presenta, está abierto a infinitas modificaciones como por ejemplo la incorporación de materiales con

propiedades magnéticas y ópticas que mejoren aún más la entrega de las posibles terapias que transporten, en el citoplasma celular. El recubrimiento con MWCNTs biodegradables, además de proporcionar una herramienta para su salida al citoplasma, permite transportar en su superficie terapias alternativas, que como se ha estudiado mediante una prueba de concepto con el colorante 5-TAMRA, o en el caso de la fisisorción del 5-FU, serán liberadas al citoplasma celular de forma efectiva, complementando la terapia que transporten las propias partículas de sílice. Por otro lado, estos MWCNTs también podrían funcionalizarse con determinados ligandos que sirvan para conducir las partículas de forma exclusiva hasta las células diana. Todas estas características hacen de este sistema una valiosa herramienta nanobiotecnológica.

4.4. Perspectivas futuras.

El objetivo último en el que se centra la presente tesis es la administración específica de los fármacos antitumorales en las células cancerígenas y en las células de sostén del tumor. Con nuestro estudio se ha contribuido al diseño de un sistema de administración de fármacos, empleando herramienta nanotecnológicas, con un gran potencial en la terapia contra el cáncer. Este diseño dará la posibilidad en un futuro, no sólo de encapsular fármacos antitumorales y entregarlos exclusivamente en las células dianas, con todo lo que esto supone en cuanto a disminución de efectos secundarios y maximización de la eficacia del tratamiento, sino que por otro lado, ofrece la posibilidad de entregar varias terapias simultáneamente en el citosol de las células tumorales.

La idea final es atacar la enfermedad por diferentes vías que se complementen, para que de esta forma, sea difícil la aparición de quimioresistencias (Luqmani, 2005). Como se ha visto en las secciones anteriores, las propiedades de superficie de los MWCNTs ofrecen la posibilidad de transportar múltiples fármacos, bien sea fisisorbidos a su superficie, como el estudio con el 5-FU (sección 4.1), o bien enlazados covalentemente mediante enlaces fácilmente degradables en el interior de las células, como el puente disulfuro (sección 4.3.2) o por ejemplo enlaces peptídicos que son fácilmente degradados en el interior de las células por las enzimas proteasas que forman parte de los lisosomas. Se podrían enlazar determinados fármacos antitumorales, que bloqueen a la célula en

diferentes fases del ciclo celular. Un ejemplo interesante es el caso del Taxol® ya que en un estudio realizado en nuestro grupo de investigación, se determinó que los MWCNTs mostraban un efecto sinérgico antitumoral en células resistentes a este fármaco (García-Hevia, 2016).

Una idea interesante, en la que se está trabajando actualmente en nuestro grupo de investigación, es la encapsulación de moléculas inhibidoras de la glucólisis aeróbica. Como se introdujo en el capítulo I, sección 1.1.1.9, las células normalmente utilizan la fosforilación oxidativa para metabolizar la glucosa, cambiando al fenotipo glicolítico solo en condiciones de hipoxia. Sin embargo, las células cancerígenas metabolizan la glucosa a través de la sobrerregulación de la glucólisis aeróbica para sobrevivir en los ambientes hipóxicos de las lesiones malignas, fenómeno conocido como efecto Warburg (Warburg *et al.*, 1927), (Warburg, 1956), el cual ofrece ventajas al crecimiento tumoral mediante la resistencia a la apoptosis. Esta característica única en el metabolismo tumoral ha identificado a la mitocondria como un blanco importante en la terapia tumoral. Existen variedad de moléculas de pequeño tamaño que tienen como diana la mitocondria celular mediante la inhibición de la glucólisis en diferentes etapas de la misma, entre ellas se puede mencionar la 2-deoxy-D-Glucosa, el ácido bromopirúvico, ácido oxámico o el ácido dicloroacético entre otras (Xintaropoulou *et al.*, 2015), (Zhang *et al.*, 2006). Estudios realizados *in vitro* en diferentes tipos de líneas celulares, muestran una IC₅₀ (del inglés *half maximal inhibitory concentration*) del orden de μM , es decir, la concentración que se necesita para inhibir el 50 % de la proliferación de las células malignas *in vitro* es pequeña, lo que indica que el efecto antitumoral de estas moléculas es muy potente. Por otro lado, la mayoría de estas moléculas presentan un pequeño tamaño, lo que hace que su encapsulación en el interior de los poros sea factible. Además, teniendo en cuenta la estructura química de algunas de estas moléculas como el ácido bromopirúvico, el ácido dicloroacético o el ácido oxámico, los cuales se tratan de ácidos carboxílicos, podrían ser enlazados fácilmente mediante reacciones químicas a la superficie de la sílice, formando enlaces peptídicos que pueden ser degradados fácilmente por las proteasas intracelulares.

De esta forma, como perspectiva futura se propone combinar fármacos que bloqueen el ciclo celular con fármacos inhibidores de la glucólisis, aprovechando las propiedades del sistema de transporte multiestructurado diseñado en nuestro laboratorio, para

conseguir que aquellas células que consigan hacerse resistentes a los inhibidores tradicionales del ciclo celular, no obtengan la energía suficiente para poder replicarse.

V. Conclusions.

"I do not feel obliged to believe that the same God who has endowed us with sense, reason, and intellect has intended us to forget their use".

Galileo Galilei.

1. It was determined that approximately 3% of the mass of the 5-FU-MWCNTs sample, corresponds to 5-FU physisorbed on the surface of the carbon nanotubes. In addition, a significant increase in the diameter of the 5-FU-MWCNTs was observed with respect to the pristine control (p-MWCNT).
2. There is an initial release of 5-FU of approximately 30%, followed by a more sustained release pattern, getting to release 50% of the drug at 140h of incubation upon performing the release assay of the 5-FU-MWCNTs *in vitro* under physiological-like conditions.
3. In HeLa and B16F10 cells, 5-FU-MWCNTs have a greater cytotoxic effect than the sum of the effect produced by the controls (5-FU and p-MWCNTs) separately.
4. Solid melanoma tumours displayed a greater weight reduction when treated with 5-FU-MWCNTs respect to controls treated with p-MWCNTs, with 5-FU or the resuspension medium of the carbon nanotube preparation. Therefore, it is concluded that the MWCNTs act as adjuvant therapy of the drug 5-FU, enhancing its antitumoral effect.
5. Oxidized carbon nanotubes (o-MWCNTs) were more biodegradable than pristine carbon nanotubes (p-MWCNTs) *in vitro* in mouse macrophages (J774) and *in vivo* in solid melanoma tumours and in the peritumoral area.
6. o-MWCNTs produce the comparable antitumoral effect as the p-MWCNTs, thus preserving their biomimetic interaction with microtubules after the chemical modification that makes them more biodegradable.
7. A multi-therapy release system consisting of a core of SiO₂ MP and coated with biodegradable MWCNTs (SiO₂-MWCNT) was designed and developed. A dye was covalently linked to carry out a release concept test *in vitro*. It was observed that biodegradable MWCNTs help these drug delivery systems to escape from the endolysosome into the cell cytoplasm.

VI. Referencias.

“Este es el cometido más importante de la sabiduría: que las obras vayan acordes con las palabras, que el sabio sea en todas partes coherente e igual a sí mismo”.

Séneca.

- Ado Jorio GD & Dresselhaus MS (2008) Carbon nanotubes: Advanced topics in the synthesis, structure, properties and applications. Springer.
- Agostini A, Mondragon L, Bernardos A, Martínez-Máñez R, Marcos M & Sancenon F (2012) Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew Int Ed Chemie*. **51**: 1–6
- Ahmed Fouad Y & Aanei C (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* **7**(5): 1016–1036
- Al-Jamal KT, Gherardini L, Bardi G, Nunes A, Guo C, Bussy C, Herrero MA, Bianco A, Prato M, Kostarelos K & Pizzorusso T (2011) Functional motor recovery from brain ischemic insult by carbon nanotube-mediated siRNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 10952–10957
- Alberti C (2009) Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **13**: 13–21
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2010) Biología molecular de la célula 5ª Edition. ISBN: 9788428215077.
- Ali-Boucetta H, Al-Jamal KT, McCarthy D, Prato M, Bianco A & Kostarelos K (2008) Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. *Chem. Commun.* **8**: 459–461
- Amos LA & Baker TS (1979) The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* **279**: 607–612
- Andón FT & Fadeel B (2013) Programmed cell death: Molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Acc. Chem. Res.* **46**: 733–742
- Andón FT, Kapralov AA, Yanamala N, Feng W, Baygan A, Chambers BJ, Hultenby K, Ye F, Toprak MS, Brandner BD, Fornara A, Klein-Seetharaman J, Kotchey GP, Star A, Shvedova AA, Fadeel B & Kagan VE (2013) Biodegradation of single-walled carbon nanotubes by eosinophil peroxidase. *Small* **9**: 2720–2729
- Arias Mediano JL (2003) Evaluación de nanopartículas de poli(etil-2-cianoacrilato) con núcleo magnético como sistema de liberación controlada del antineoplásico 5-Fluorouracilo.
- Asefa T & Tao Z (2012) Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* **25**: 2265–2284
- Bae KH, Chung HJ & Park TG (2011) Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol. Cells* **31**: 295–302
- Baeza A, Guisasola E, Ruiz-Hernández E & Vallet-Regí M (2012) Magnetically triggered multidrug release by hybrid mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Mater.* **24**: 517–524
- Barnett G, West C, Dunning A, Elliott R, Coles C, Pharoah P & Burnet N (2009) Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 134–42
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 611–22
- Bokobza L (2007) Multiwall carbon nanotube elastomeric composites: A review. *Polymer (Guildf)*. **48**: 4907–4920
- Bourzac K (2012) Carrying drugs. *Nature* **491**: S58–S60
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R & De Mey J (1981) Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 5608–5612

- Burkhardt DL & Sage J (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 671–682
- Bussy C, Hadad C, Prato M, Bianco A & Kostarelos K (2016) Intracellular degradation of chemically functionalized carbon nanotubes using a long-term primary microglial culture model. *Nanoscale* **8**: 590–601
- Cai D, Doughty CA, Potocky TB, Dufort FJ, Huang Z, Blair D, Kempa K, Ren ZF & Chiles TC (2007) Carbon nanotube-mediated delivery of nucleic acids does not result in non-specific activation of B lymphocytes. *Nanotechnology* **18**: 365101
- Campidelli S, Sooambar C, Diz EL, Ehli C, Guldi DM & Prato M (2006) Dendrimer-functionalized single-wall carbon nanotubes: Synthesis, characterization, and photoinduced electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 12544–12552
- Carrier MF & Pantaloni D (1981) Kinetic Analysis of Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis Associated with Tubulin Polymerization. *Biochemistry* **20**: 1918–1924
- Cauda V, Argyo C & Bein T (2010a) Impact of different PEGylation patterns on the long-term biostability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **20**: 8693–9
- Cauda V, Schlossbauer A & Bein T (2010b) Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous Mesoporous Mater.* **132**: 60–71
- Chabner BA & Roberts TG (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 65–72
- Chen D, Hao N, Liu H, Li L, Chen D & Li L (2012) In vitro degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions. *Nanosci Nanotechnol.* **12**: 6346–54
- Chen J, Chen S, Zhao X, Kuznetsova L V., Wong SS & Ojima I (2008) Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **130**: 16778–16785
- Chen J, Liu T, Dong X & Hu Y (2009) Recent development and SAR analysis of colchicine binding site inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**: 1174–90
- Chen Y, Chen H & Shi J (2013) In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Adv. Mater.* **25**: 1–33
- Cheng YJ, Luo GF, Zhu JY, Xu XD, Zeng X, Cheng DB, Li YM, Wu Y, Zhang XZ, Zhuo RX & He F (2015) Enzyme-induced and tumor-targeted drug delivery system based on multifunctional mesoporous silica nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**: 9078–9087
- Ciobotaru CC, Damian MC, Polosan S, Matei E & Iovu H (2014) Covalent functionalization of single walled carbon nanotubes with doxorubicin for controlled drug delivery systems. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **9**: 413–422
- Del Corro E, González J, Taravillo M, Flahaut E & Baonza VG (2008) Raman spectra of double-wall carbon nanotubes under extreme uniaxial stress. *Nano Lett.* **8**: 2215–2218
- Costa RR & Mano JF (2013) Layer-by-layer self-assembly techniques for nanostructured devices in tissue engineering. Woodhead Publishing Limited
- Coyoy-Salgado A & Morán J (2012) Papel de las ERO Producidas por la NOX en Procesos Fisiológicos. *Rev* **31**: 100–109
- Decher G, Hong JD & Schmitt J (1992) Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **210/211**: 831–835
- Desai A & Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83–117

- Dong C, Eldawud R, Sargent LM, Kashon ML, Lowry D, Rojanasakul Y & Zoica Dinu C (2015) Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung epithelial cells in a time-dependent manner. *J. Mater. Chem. B* **3**: 3983–3992
- Egeblad M, Nakasone ES & Werb Z (2010) Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* **18**: 884–901
- Elgrabli D, Dachraoui W, Ménard-Moyon C, Liu XJ, Bégin D, Bégin-Colin S, Bianco A, Gazeau F & Alloyeau D (2015a) Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano* **9**: 10113–10124
- Elgrabli D, Dachraoui W, Ménard-Moyon C, Liu XJ, Bégin D, Bégin-Colin S, Bianco A, Gazeau F & Alloyeau D (2015b) Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano* **9**: 10113–10124
- Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, Boczkowski J & Lacroix G (2008) Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Part. Fibre Toxicol.* **5**: 20
- Evans L, Mitchison T & Kirschner M (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**: 1185–1191
- Fanarraga ML, Valiente R & González J (2014) Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores. N° patente: ES2478793B2.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP & Langer R (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 6315–6320
- Farrera C, Bhattacharya K, Lazzaretto B, Andón FT, Hultenby K, Kotchey GP, Star A & Fadeel B (2014) Extracellular entrapment and degradation of single-walled carbon nanotubes. *Nanoscale* **6**: 6974
- Ferris DP, Zhao YL, Khashab NM, Khatib HA, Stoddart JF & Zink JJ (2009) Light-operated mechanized nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **131**: 1686–1688
- Fesik SW (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 876–885
- Filgueiras M de C, Morrot A, Soares PMG, Costa ML & Mermelstein C (2013) Effects of 5-Fluorouracil in Nuclear and Cellular Morphology, Proliferation, Cell Cycle, Apoptosis, Cytoskeletal and Caveolar Distribution in Primary Cultures of Smooth Muscle Cells. *PLoS One* **8**:
- Freeman EC, Weiland LM & Meng WS (2013) Modeling the proton sponge hypothesis: Examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **24**: 398–416
- García-Hevia L (2016) Terapia contra el cáncer basada en la biomimética de los nanotubos de carbono con los filamentos celulares.
- García-Hevia L, Fernández F, Casafont I, Villegas JC & Fanarraga ML (2016a) A fast , reliable and cost-effective method to generate tumor organs for therapy screening in vivo A fast , reliable and cost-effective method to generate tumor organs for therapy screening in vivo. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2**: 035009
- García-Hevia L, Fernández F, Grávalos C, García A, Villegas JC & Fanarraga ML (2014) Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine. *Nanomedicine* **9**: 1581–1588
- García-Hevia L, Valiente R, Fernández-Luna JL, Flahaut E, Rodríguez-Fernández L, Villegas JC, González J & Fanarraga ML (2015a) Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Adv. Healthc. Mater.* **4**: 1640–1644

- García-Hevia L, Valiente R, González J, Fernández-Luna JL, Villegas JC & Fanarraga ML (2015b) Anti-cancer cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes. *Curr. Pharm. Des.* **21**: 1920–1929
- García-Hevia L, Villegas JC, Fernández F, Casafont Í, González J, Valiente R & Fanarraga ML (2016b) Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Tumor Progression in a Mouse Model. *Adv. Healthc. Mater.* **5**: 1080–1087
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, et al (2012) Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**: 883–892
- Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JTM, Fojo T & Poruchynsky MS (1997) Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant β -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.* **272**: 17118–17125
- Gilmore AP (2005) Anoikis. *Cell Death Differ.* **12**: 1473–1477
- Gong H, Xie Z, Liu M, Zhu H & Sun H (2015) Redox-sensitive mesoporous silica nanoparticles functionalized with PEG through a disulfide bond linker for potential anticancer drug delivery. *RSC Adv.* **5**: 59576–59582
- Gong KP, Yan YM, Zhang MN, Su L, Xiong SX & Mao LQ (2005) Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: A review. *Anal. Sci.* **21**: 1383–1393
- González-Domínguez E, Iturrioz-Rodríguez N, Padín-González E, Villegas J, García-Hevia L & Pérez-Lorenzo M (2017) Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible. *Int. J. Nanomedicine* **12**: 6317–28
- González J & Manjon F. (2015) Vibrational Spectroscopy, an introduction to High-Pressure science and technology. In
- González J & Marquina J (2011) Fundamentos de la Dispersión Raman: algunos efectos de las altas presiones. *Mater. a Alta Presión Fundam. y Apl.*: 163–182
- Gottardi R & Douradinha B (2013) Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and cancer. *J. Nanobiotechnology* **11**: 30
- Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME & DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11613–11618
- Gu YJ, Cheng J, Jin J, Cheng SH & Wong WT (2011) Development and evaluation of pH-responsive single-walled carbon nanotube-doxorubicin complexes in cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* **6**: 2889–2898
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S, Coant N, Daniel F & Ogier-Denis E (2006a) The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases. *Médecine Sci. M/S* **22**: 953–9
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S, Coant N, Daniel F & Ogier-Denis E (2006b) [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Médecine Sci. M/S* **22**: 953–9
- Gujam FJA, Edwards J, Mohammed ZMA, Going JJ & McMillan DC (2014) The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* **111**: 157–165
- Gupta S, Hughes M, Windle AH & Robertson J (2004) Charge transfer in carbon nanotube actuators investigated using *in situ* Raman spectroscopy. *J. Appl. Phys.* **95**: 2038–2048
- Hamada N, Sawada SI & Oshiyama A (1992) New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Phys. Rev. Lett.* **68**: 1579–1581
- Hamilton RF, Wu Z, Mitra S, Shaw PK & Holian A (2013) Effect of MWCNT size, carboxylation,

- and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. *Part. Fibre Toxicol.* **10**: 1
- Hampton MB, Kettle AJ & Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007–17
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646–674
- Hartono SB, Gu W, Kleitz F, Liu J, He L, Middelberg APJ, Yu C, Lu GQ & Qiao SZ (2012) Poly-L-lysine functionalized large pore cubic mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for gene delivery. *ACS Nano* **6**: 2104–2117
- Hida K, Maishi N, Torii C & Hida Y (2016) Tumor angiogenesis- characteristics of tumor endothelial cells. *Int. J. Clin. Oncol.* **21**: 206–212
- Hiraki J (2000) Basic and applied studies on ϵ -polylysine. *Fine Chem.* **29**: 25–28
- Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, Seki H, Uohama K, Seki H, Kimura S, Yanagimoto Y & Barnett JW (2003) Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **37**: 328–340
- Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF & Dahl KN (2010) Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex Vivo. *ACS Nano* **4**: 4872–4878
- Hölzel M, Bovier A & Tüting T (2013) Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat. Rev. Cancer* **13**: 365–376
- Hou J, Wan B, Yang Y, Ren XM, Guo LH & Liu JF (2016) Biodegradation of single-walled carbon nanotubes in macrophages through respiratory burst modulation. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 409
- Hu J, Mao Z, Zhang Y & Gao C (2011) Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells. *J. Nanosci. Lett.* **1**: 1–16
- Huang X, Li L, Liu T, Hao N, Liu H, Chen D & Tang F (2011) The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano* **5**: 5390–5399
- Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**: 56–58
- Inoue Y, Kuad P, Okumura Y, Takashima Y, Yamaguchi H & Harada A (2007) Thermal and photochemical switching of conformation of poly(ethylene glycol)-substituted cyclodextrin with an azobenzene group at the chain end. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 6396–6397
- Iturrioz-Rodríguez N, Correa-Duarte MA & Fanarraga ML Mesoporous silica particles as controlled drug delivery systems in cancer. *Curr. Pharm. Des.:* In press
- Iturrioz-Rodríguez N, González-Lavado E, Marin L, Araujo B, Perez-Lorenzo M & Fanarraga M (2017) A biomimetic escape strategy for cytoplasm invasion by synthetic particles. *Angew Int Ed Chemie.* **56**: 13736–40
- Jang J, Cha S, Choi Y, Kang D, Butler T, Hasko D, Jung J, Kim J & Amaratunga G (2008) Nanoscale memory cell based on a nanoelectromechanical switched capacitor. *Nat. Nanotechnol.* **3**: 26–30
- Jaque D, Rosal B del, Rodríguez EM, Maestro LM, Haro-González P & Solé JG (2014) Fluorescent nanothermometers for intracellular thermal sensing. *Nanomedicine* **9**: 1047–1062
- Ji L, Chen W, Zheng S, Xu Z & Zhu D (2009) Adsorption of sulfonamide antibiotics to multiwalled carbon nanotubes. *Langmuir* **25**: 11608–11613
- Ji L, Shao Y, Xu Z, Zheng S & Zhu D (2010) Adsorption of monoaromatic compounds and pharmaceutical antibiotics on carbon nanotubes activated by KOH etching. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 6429–6436
- Jia Y, Wei J, Wang K, Cao A, Shu Q, Gui X, Zhu Y, Zhuang D, Zhang G, Ma B, Wang L, Liu W, Wang Z, Luo J & Wu D (2008) Nanotube-Silicon Heterojunction Solar Cells. *Adv. Mater.* **20**:

4594–4598

- Jiang Y, Arounleut P, Rheiner S, Bae Y, Kabanov A V., Milligan C & Manickam DS (2016) SOD1 nanozyme with reduced toxicity and MPS accumulation. *J. Control. Release* **231**: 38–49
- Jiang Y, Brynskikh AM, S-Manickam D & Kabanov A V. (2015) SOD1 nanozyme salvages ischemic brain by locally protecting cerebral vasculature. *J. Control. Release* **213**: 36–44
- Jones RG & Thompson CB (2009) Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**: 537–548
- Jordan MA & Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 253–265
- Jorge J, Flahaut E, Gonzalez-Jimenez F, Gonzalez G, Gonzalez J, Belandria E, Broto JM & Raquet B (2008) Preparation and characterization of α -Fe nanowires located inside double wall carbon nanotubes. *Chem. Phys. Lett.* **457**: 347–351
- Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S & Campone M (2013) Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**: 455–465
- Kabbashi N, Atieh M, Al-Mamun A, Mirghami M, Alam M & Yahya N (2009) Kinetic adsorption of application of carbon nanotubes for Pb(II) removal from aqueous solution. *J. Environ. Sci.* **21**: 539–544
- Kadlecova Z, Rajendra Y, Matasci M, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM & Klok HA (2013) DNA delivery with hyperbranched polylysine: A comparative study with linear and dendritic polylysine. *J. Control. Release* **169**: 276–288
- Kagan VE, Kapralov AA, St. Croix CM, Watkins SC, Kisin ER, Kotchey GP, Balasubramanian K, Vlasova II, Yu J, Kim K, Seo W, Mallampalli RK, Star A & Shvedova AA (2014) Lung macrophages Digest carbon nanotubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway. *ACS Nano* **8**: 5610–5621
- Kagan VE, Konduru N V., Feng W, Allen BL, Conroy J, Volkov Y, Vlasova II, Belikova NA, Yanamala N, Kapralov A, Tyurina YY, Shi J, Kisin ER, Murray AR, Franks J, Stolz D, Gou P, Klein-Seetharaman J, Fadeel B, Star A, et al (2010) Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat. Nanotechnol.* **5**: 354–359
- Kaplan H (1970) Radiobiology's contribution to radiotherapy: promise or mirage? *Radiat. Res.* **43**: 460–76
- Kateb B, Van Handel M, Zhang L, Bronikowski MJ, Manohara H & Badie B (2007) Internalization of MWCNTs by microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors. *Neuroimage* **37**: 9–17
- Kaur S, Mehra NK, Jain K & Jain NK (2017) Development and evaluation of targeting ligand-anchored CNTs as prospective targeted drug delivery system. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **45**: 242–250
- Khosravian P, Ardestani M, Khoobi M, Ostad S, Dorkoosh F & Javar H (2016) Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Onco. Targets Ther.* **9**: 7315–30
- Koff JL, Ramachandiran S & Bernal-Mizrachi L (2015) A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 2942–2955
- Kostarelos K (2008) The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat. Biotechnol.* **26**: 774–776
- Kurapati R, Mukherjee SP, Martín C, Bepete G, Vázquez E, Pénicaud A, Fadeel B & Bianco A (2018) Degradation of Single-Layer and Few-Layer Graphene by Neutrophil Myeloperoxidase. *Angew. Chemie Int. Ed.* **57**: 11722–11727
- Labi V & Erlacher M (2015) How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis.* **6**: e1675

- Lacerda L, Herrero MA, Venner K, Bianco A, Prato M & Kostarelos K (2008) Carbon-nanotube shape and individualization critical for renal excretion. *Small* **4**: 1130–1132
- Lacerda L, Russier J, Pastorin G, Herrero MA, Venturelli E, Dumortier H, Al-Jamal KT, Prato M, Kostarelos K & Bianco A (2012) Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* **33**: 3334–3343
- Lai D, Visser-Grieve S & Yang X (2012) Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep.* **32**: 361–374
- Lam C-W, James JT, McCluskey R & Hunter RL (2004) Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* **77**: 126–134
- Laurent S, Dutz S, Häfeli UO & Mahmoudi M (2011) Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**: 8–23
- Lee JK, Sayers BC, Chun KS, Lao HC, Shipley-Phillips JK, Bonner JC & Langenbach R (2012) Multi-walled carbon nanotubes induce COX-2 and iNOS expression via MAP Kinase-dependent and -independent mechanisms in mouse RAW264.7 macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* **9**: 1
- Li H, DeRosier DJ, Nicholson W V., Nogales E & Downing KH (2002) Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* **10**: 1317–1328
- Li X, Peng Y & Qu X (2006) Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B-A transition in solution. *Nucleic Acids Res.* **34**: 3670–3676
- Liu X, Wang M, Zhang S & Pan B (2013) Application potential of carbon nanotubes in water treatment: A review. *J. Environ. Sci.* **25**: 1263–1280
- Liu Y, Ding X, Li J, Luo Z, Hu Y, Liu J, Dai L, Zhou J, Hou C & Cai K (2015) Enzyme responsive drug delivery system based on mesoporous silica nanoparticles for tumor therapy in vivo. *Nanotechnology* **26**: 145102
- Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X & Dai H (2008) Drug Delivery with Carbon Nanotubes for In vivo Cancer Treatment. : 6652–6661
- Llinas MC & Sánchez D (2014) Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Affin. LXXI* **565**: 20–31
- Longley DB, Harkin DP & Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 330–338
- Lopez CF, Nielsen SO, Moore PB & Klein ML (2004) Understanding nature's design for a nanosyringe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 4431–4434
- Lopez J (2015) Mitochondrial apoptosis: killing cancer using enemy within. *Br J Cancer* **112**: 957–962
- Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI & Tamanoi F (2010) Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small* **6**: 1794–1805
- Lu JP (1997) Elastic properties of carbon nanotubes and nanoropes. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 1297–1300
- Luqmani YA (2005) Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* **14**: 35–48
- Ma D (2014) Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale* **6**: 6415–25
- Madani SY, Mandel A & Seifalian AM (2013) A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev.* **4**: 21521
- Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A & Seifalian AM (2011) A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int. J. Nanomedicine* **6**: 2963–2979

- Maggini M, Scorrano G & Prato M (1993) Addition of Azomethine Ylides to C60: Synthesis, Characterization, and Functionalization of Fullerene Pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 9798–9799
- Mallakpour S & Soltanian S (2015) A facile approach towards functionalization of MWCNTs with vitamin B2 for reinforcing of biodegradable and chiral poly(ester-imide) having L-phenylalanine linkages: morphological and thermal investigations. *J. Polym. Res.* **22**: 183
- Mallakpour S & Soltanian S (2016) Surface functionalization of carbon nanotubes: Fabrication and applications. *RSC Adv.* **6**: 109916–109935
- Marchesan S, Kostarelos K, Bianco A & Prato M (2015) The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. *Mater. Today* **18**: 12–19
- Massagué J & Obenauf AC (2016) Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**: 298–306
- Matson DR & Stukenberg PT (2011) Spindle Poisons and Cell Fate: A Tale of Two Pathways. *Mol. Interv.* **11**: 141–150
- Matyszevska D, Napora E, Żelechowska K, Biernat JF & Bilewicz R (2018) Synthesis, characterization, and interactions of single-walled carbon nanotubes modified with doxorubicin with Langmuir–Blodgett biomimetic membranes. *J. Nanoparticle Res.* **20**: 143
- Mazia D, Schatten G & Sale W (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine: Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* **66**: 198–200
- Mekaru H, Lu J & Tamanoi F (2015) Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **95**: 40–49
- Meng H, Wang M, Liu H, Situ A & Wu B (2015) Use of a Lipid-Coated mesoporous silica nanoparticle platform for synergistic gemcitabine and paclitaxel delivery to human pancreatic cancer in mice. *ACS Nano* **9**: 3540–57
- Mioduszevska K, Dołzonek J, Wyrzykowski D, Kubik Ł, Wiczling P, Sikorska C, Toński M, Kaczyński Z, Stepnowski P & Białk-Bielińska A (2017) Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **97**: 283–296
- Mitchison TJ & Salmon ED (2001) Mitosis: A history of division. *Nat. Cell Biol.* **3**: 530
- Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C & Sasaki I (2010) 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers (Basel)*. **2**: 1717–1730
- Monopoli MP, Åberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**: 779–786
- Mura S, Nicolas J & Couvreur P (2013) Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**: 991–1003
- Nasir S, Hussein MZ, Zainal Z & Yusof NA (2018) Carbon-based nanomaterials/allotropes: A glimpse of their synthesis, properties and some applications. *Materials (Basel)*. **11**: 1–24
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA & Downing KH (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**: 79–88
- Nunes A, Bussy C, Gherardini L, Meneghetti M, Herrero MA, Bianco A, Prato M, Pizzorusso T, Al-Jamal KT & Kostarelos K (2012) In vivo degradation of functionalized carbon nanotubes after stereotactic administration in the brain cortex. *Nanomedicine* **7**: 1485–1494
- Oh N & Park J (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* **9**: 51–63

- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H & Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**: 7280–7295
- Pampaloni F & Florin EL (2008) Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* **26**: 302–310
- Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K & Bianco A (2004) Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**: 5242–5246
- Paris J, Cabañas M, Manzano M & Vallet-Regi M (2015) Polymer-grafted mesoporous silica nanoparticles as ultrasound-responsive drug carriers. *ACS Nano* **9**: 11023–333
- Park TG, Jeong JH & Kim SW (2006) Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 467–486
- Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Briand J-P, Kostarelos K, Prato M & Bianco A (2006) Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem. Commun. (Camb).* **1**: 1182–1184
- Peer D, Karp J, Hong S, Farokhzad O, Margalit R & Langer R (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nano.* **2**: 751–60
- Pelaz B, Del Pino P, Maffre P, Hartmann R, Gallego M, Rivera-Fernández S, De La Fuente JM, Nienhaus GU & Parak WJ (2015) Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **9**: 6996–7008
- Peng C, Jin J & Chen G (2007) A comparative study on electrochemical co-deposition and capacitance of composite films of conducting polymers and carbon nanotubes. *Electrochim. Acta* **53**: 525–537
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W & Donaldson K (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* **3**: 423–428
- Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley PA & Welland M (2007) Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat. Nanotechnol.* **2**: 713–717
- Portet C, Yushin G & Gogotsi Y (2007) Electrochemical performance of carbon onions, nanodiamonds, carbon black and multiwalled nanotubes in electrical double layer capacitors. *Carbon N. Y.* **45**: 2511–2518
- Qian BZ & Pollard JW (2010) Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **141**: 39–51
- Qianjun H, Xiangzhi C, Fangming C, Limin G & Jianlin S (2009) Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nano-spheres under a neutral condition. *Microporous Mesoporous Mater.* **117**: 609–616
- Ravichandran P, Periyakaruppan A, Sadanandan B, Ramesh V, Hall JC, Jejelowo O & Ramesh GT (2009) Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells by multiwalled carbon nanotubes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **23**: 333–344
- Reibold M, Paufler P, Levin AA, Kochmann W, Pätzke N & Meyer DC (2006) Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* **444**: 286
- Ren X, Chen C, Nagatsu M & Wang X (2011) Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. *Chem. Eng. J.* **170**: 395–410
- Riggio C, Ciofani G, Raffa V, Cuschieri A & Micera S (2009) Combination of Polymer Technology and Carbon Nanotube Array for the Development of an Effective Drug Delivery System at Cellular Level. *Nanoscale Res. Lett.* **4**: 668–673

- Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A & Schaudien D (2014) The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part. Fibre Toxicol.* **11**: 1-18
- Robbins & Cotran (2006) Patología Estructural y Funcional España: Saunders
- Rodríguez-Fernández L, Valiente R, González J, Villegas JC & Fanarraga ML (2012) Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano* **6**: 6614-6625
- Rosenholm J, Sahlgren C & Linden M (2011) Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr. Drugs Targets* **12**: 1166-86
- Rubinson K & Robinson J (2001) Análisis instrumental
- Russier J, Oudjedi L, Piponnier M, Bussy C, Prato M, Kostarelos K, Lounis B, Bianco A, Cognet L, Russier J, Oudjedi L, Piponnier M, Bussy C, Prato M, Russier J, Oudjedi L & Piponnier M (2017) Direct visualization of carbon nanotube degradation in primary cells by photothermal imaging. *Nanoscale* **9**: 4642-4645
- Sailor MJ & Park J-H (2012) Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Adv. Mater.* **24**: 3779-802
- Saito G, Swanson JA & Lee KD (2003) Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: Role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**: 199-215
- Saptarshi SR, Duschl A & Lopata AL (2013) Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **11**: 1-12
- Scheinberg DA, McDevitt MR, Dao T, Mulvey JJ, Feinberg E & Alidori S (2013) Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**: 2016-2022
- Schreiber RD, Old LJ & Smyth MJ (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-.).* **331**: 1565-1570
- Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T & Anderson DG (2012) Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 39-50
- Sengupta B, Gregory WE, Zhu J, Dasetty S, Karakaya M, Brown JM, Rao AM, Barrows JK, Sarupria S & Podila R (2015) Influence of carbon nanomaterial defects on the formation of protein corona. *RSC Adv.* **5**: 82395-82402
- Seo W, Kapralov AA, Shurin G V., Shurin MR, Kagan VE & Star A (2015) Payload drug vs. nanocarrier biodegradation by myeloperoxidase- and peroxynitrite-mediated oxidations: pharmacokinetic implications. *Nanoscale* **7**: 8689-8694
- Serpell CJ, Kostarelos K & Davis BG (2016) Can Carbon Nanotubes Deliver on Their Promise in Biology? Harnessing Unique Properties for Unparalleled Applications. *ACS Cent Sci* **2**: 190-200
- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Mi F, Stroeve P & Mahmoudi M (2012) Toxicity of nanomaterials. *TL - 41. Chem. Soc. Rev.* **41** VN-r: 2323-2343
- Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**: 103-112
- Shi X, Von Dem Bussche A, Hurt RH, Kane AB & Gao H (2011) Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat. Nanotechnol.* **6**: 714-719
- Shoval A, Adams C, David-Pur M, Shein M, Hanein Y & Sernagor E (2009) Carbon nanotube electrodes for effective interfacing with retinal tissue. *Front. Neuroeng.* **2**: 4
- Silva WM, Ribeiro H, Seara LM, Calado HDR, Ferlauto AS, Paniago RM, Leite CF & Silva GG

- (2012) Surface properties of oxidized and aminated multi-walled carbon nanotubes. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**: 1078–1086
- Silverstein R, Bassler G & Morrill T (1981) Spectrometric Identification of Organic Compounds 4th ed. Sons JW and (ed) New York
- Simon P & Gogotsi Y (2008) Materials for electrochemical capacitors. *Nat. Mater.* **7**: 845–54
- Singh P, Campidelli S, Giordani S, Bonifazi D, Bianco A & Prato M (2009) Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 2214–2230
- Slowing II, Vivero-escoto JL, Wu C & Lin VS (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **60**: 1278–1288
- Sokolov K (2013) Nanotechnology: Tiny thermometers used in living cells. *Nature* **500**: 36–37
- Son K, Hong J & Lee J (2016) Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators. *Int. J. Nanomedicine* **11**: 5163–5185
- Stix G (2007) Función maligna de la inflamación. *Investig. Cienc.* **79**: 22–32
- Stöber W, Fink A & Bohn E (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**: 62–69
- Sutherland K, Mahoney JR, Coury AJ & Eaton JW (1993) Degradation of biomaterials by phagocyte-derived oxidants. *J. Clin. Invest.* **92**: 2360–2367
- Syrgiannis Z, Melchionna M & Prato M (2014) Covalent Carbon Nanotube Functionalization. *Encycl. Polym. Nanomater.*: 1–8
- Tasis D, Tagmatarchis N, Bianco A & Prato M (2006) Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* **106**: 1105–1136
- Tilmaçiu CM, Soula B, Galibert AM, Lukanov P, Datas L, González J, Barquín LF, Rodríguez Fernández J, González-Jiménez F, Jorge J & Flahaut E (2009) Synthesis of superparamagnetic iron(III) oxide nanowires in double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.*: 6664–6666
- Toma FM (2009) Covalently functionalized carbon nanotubes and their biological applications.
- Toński M, Dołżonek J, Paszkiewicz M, Wojsławski J, Stepnowski P & Białk-Bielińska A (2018) Preliminary evaluation of the application of carbon nanotubes as potential adsorbents for the elimination of selected anticancer drugs from water matrices. *Chemosphere* **201**: 32–40
- Torres-Lugo M & Rinaldi C (2013) Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles. *Nanomedicine* **8**: 1689–1707
- Treacy MMJ, Ebbesen TW & Gibson JM (1996) Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* **381**: 678–680
- Upadhyayula VKK, Deng S, Mitchell MC & Smith GB (2009) Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. *Sci. Total Environ.* **408**: 1–13
- Vallet-Regí M, Colilla M & Izquierdo-Barba I (2018) Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights. *Molecules* **23**: 1–19
- Vander M, Cantley L & Thompson C (2009) Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science (80-.).* **324**: 1029–1033
- Varela I (2007) Heterogeneidad intratumoral. *Investig. Cienc.* **79**: 32–33
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman ZN, Vermeulen K, Van Bockstaele DR & Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**: 131–149
- Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R & Fanarraga ML

- (2014) Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering with Cell Migration and Phagocytosis. *Adv. Healthc. Mater.* **3**: 424–432
- Vlasova II, Vakhrusheva T V., Sokolov A V., Kostevich VA, Gusev AA, Gusev SA, Melnikova VI & Lobach AS (2012) PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**: 131–142
- Wang J, Byrne JD, Napier ME & Desimone JM (2011) More effective nanomedicines through particle design. *Small* **7**: 1919–1931
- Wang Z, Johns VK & Liao Y (2014) Controlled release of fragrant molecules with visible light. *Chem. - A Eur. J.* **20**: 14637–14640
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science (80-.)*. **123**: 309–314
- Warburg O, Wind F & E N (1927) The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**: 519–530
- Weisenberg RC (1972) Microtubule Formation in vitro in Solutions Containing Low Calcium Concentrations. *Science (80-.)*. **177**: 1104–1105
- Wu S-H, Mou C-Y & Lin H-P (2013) Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **42**: 3862
- Wu S & Butt HJ (2016) Near-Infrared-Sensitive Materials Based on Upconverting Nanoparticles. *Adv. Mater.* **28**: 1208–1226
- Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Mathur S, Song X, Xiao L, Oldenberg SJ, Fadeel B & Riviere JE (2011) Mapping the surface adsorption forces of nanomaterials in biological systems. *ACS Nano* **5**: 9074–9081
- Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, Marston H, Turnbull A & Langdon SP (2015) A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* **6**: 25677–25695
- Yang K & Xing B (2009) Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. *Environ. Pollut.* **157**: 1095–1100
- Yang W, Lu Y, Zheng F, Xue X, Li N & Liu D (2012) Adsorption behavior and mechanisms of norfloxacin onto porous resins and carbon nanotube. *Chem. Eng. J.* **179**: 112–118
- Yehia HN, Draper RK, Mikoryak C, Walker EK, Bajaj P, Musselman IH, Daigrepont MC, Dieckmann GR & Pantano P (2007) Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J. Nanobiotechnology* **5**: 8
- Yen C, Lin Y, Liao S, Weng C, Huang C, Hsiao Y, Ma C-C, Chang M, Shao H, Tsai M, Hsieh C, Tsai C & Weng F (2008) Preparation and properties of a carbon nanotube-based nanocomposite photoanode for dye-sensitized solar cells. *Nanotechnology* **19**: 375305
- Yeung SJ, Pan J & Lee MH (2008) Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - The seventh hallmark of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 3981–3999
- Zanella R (2012) Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *www.mundonano.unam.mx* **5**: 69–81
- Zhang J, Zou HL, Qing Q, Yang YL, Li QW, Liu ZF, Guo XY & Du ZL (2003) Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B* **107**: 3712–3718
- Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L & Icard P (2006) Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *3566*: 3561–3566
- Zhao B, Hu H, Mandal SK & Haddon RC (2005) A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chem. Mater.* **17**: 3235–3241

- Zhong J, Song L, Meng J, Gao B, Chu W, Xu H, Luo Y, Guo J, Marcelli A, Xie S & Wu Z (2009) Bio-nano interaction of proteins adsorbed on single-walled carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **47**: 967-973
- Zhou J & Giannakakou P (2005) Targeting Microtubules for Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents* **5**: 65-71
- Zimmer C (2007) Biología evolutiva del cáncer. *Investig. Cienc.* **79**: 6-13

VII. Artículos.

“Todo en el mundo es extraño y maravilloso para unas pupilas bien abiertas (...) por eso los antiguos dieron a Minerva la lechuza, el pájaro con los ojos siempre deslumbrados”.

José Ortega y Gasset.

ARTÍCULOS

1. **González-Lavado E**, Iturrioz-Rodríguez N, Padín-González E, González J, García-Hevia L, Heuts J, Pesquera C, González F, Villegas JC, Valiente R and Fanarraga ML **(2018)**. *Biodegradable multi-walled carbon nanotubes trigger anti-tumoral effects*. *Nanoscale* 10: 11013-11020.
2. Iturrioz-Rodríguez N, González-Domínguez E, **González-Lavado E**, Marín-Caba L, Vaz B, Pérez-Lorenzo M, Correa-Duarte MA and Fanarraga ML **(2017)**. *A synthetic getaway biomimetic strategy for cytoplasm particle invasion*. *Angewandte Chemie International Edition*. 129:13924-13928.
3. García-Calvo J, Ibeas S, Antón-García E, Torroba T, González-Aguilar G, Antunes W, **González-Lavado E**, Fanarraga ML **(2017)**. *Potassium-Ion-Selective Fluorescent Sensors To Detect Cereulide, the Emetic Toxin of B. cereus, in Food Samples and HeLa Cells*. *ChemistryOpen Journal* 4: 562-570.
4. Carlos Renero-Lecuna, Nerea Iturrioz-Rodríguez, **Eloisa González-Lavado**, Esperanza Padín-González, Elena Navarro-Palomares, Lourdes Valdivia-Fernández, Lorena García-Hevia, Mónica L Fanarraga, Lorena González-Legarreta. **(2018)**. *Interaction of nanomaterials with HeLa cells*. *Journal of Nanomaterials*. En revisión.
5. Esperanza Padín-González, **Eloisa González-Lavado**, Elena Navarro-Palomares, Nerea Iturrioz-Rodríguez, Lourdes Valdivia, Miguel Angel Correa-Duarte, Ravael Valiente and Mónica L. Fanarraga. **(2018)**. *Protein engineered coating as a strategy for custom biofunctionalization of nanomaterials*. (submitted).

E. González-Lavado, N. Iturrioz-Rodríguez, E. Padín-González, J. González, L. García-Hevia, J. Heuts, C. Pesquera, a F. González, J. C. Villegas, R. Valiente, M. L. Fanarraga *Biodegradable multi-walled carbon nanotubes trigger antitumoral effects*

Nanoscale, 2018,10, 11013-11020

[DOI:10.1039/C8NR03036G](https://doi.org/10.1039/C8NR03036G)

COMMUNICATION

A synthetic getaway biomimetic strategy for cytoplasm particle invasion

N. Iturrioz-Rodríguez^{#[a]}, E. González-Domínguez^{#[b]}, E. González-Lavado^[a], L. Marín-Caba^[b], B. Vaz^[b]
M. Pérez-Lorenzo^[b], M. A. Correa-Duarte^{*[b]} and M. L. Fanarraga^{*[a]}

Abstract: *The translocation of nanomaterials or complex delivery systems into the cytosol is a main challenge in nanobiotechnology. After receptor-mediated endocytosis, most nanomaterials are sequestered undergoing degradation, therapy inactivation or exocytosis. Here we explore a novel surface particle-coating made of adsorbed carbon nanotubes that provides coated materials with new properties that reproduce the viral cell invasive mechanisms, namely: receptor mediated endocytosis, endo-lysosomal escape and cytosolic particle release preserving intact cell viability. This novel biomimetic coating design will enable the intracytoplasmic delivery of many different functional materials endowed with therapeutic, magnetic, optical or catalytic functionalities thus, opening the door to a wide array of chemical and physical processes within the cytosolic or nuclear domains, and supporting the generation of new developments in the biotechnological, pharmaceutical and biomedical industries.*

Probably the biggest challenge in biotechnology and medicine is the design of versatile tools for targeted intracellular delivery of *ad hoc* combinations of materials and bioactive molecules for cell manipulation. Current nanodevices offer limited solutions to the cytoplasmic delivery problem of active compounds, being the biggest challenges: (i) specific cell recognition, (ii) preservation of the cargo from the hostile lysosomal chemical conditions, (iii) non-lethal endo-lysosomal (E-L) escape, (iv) carriage of different particles or chemicals into the cytosol, and finally, (v) clearance of the delivery vectors to avoid long-term cytotoxicity.

To date, there is only partial understanding of how to control the intracellular fate of the carrier systems after endocytosis. Most delivery vectors get trapped in the E-L vesicles, where the hostile enzymatic and chemical conditions destroy the nanomaterials and/or inactivate the therapies.^[1,2] Thus, there is a need for effective strategies triggering viable synthetic E-L membrane translocation.^[3]

In nature, viruses can penetrate into the cytosol after receptor-endocytic uptake preserving intact cell viability.^[4] To escape the membranes, viruses exploit the changing chemical environment of the E-L compartments. The progressively reducing conditions in the maturing endosomes trigger the viral-coating spike polypeptide unfolding and the exposure of hydrophobic protein

residues that penetrate in the E-L membrane, forming pores, and allowing viral release into the cytosol.

Nanobiotechnology can imitate these sophisticated mechanisms to improve nano-carrier E-L translocation into the cytoplasm. In terms of particle design, these steps implicate: (i) surface receptor binding triggering endocytic cell entry, (ii) protection of the cargo/particle, and finally, and (iii) E-L membrane permeabilization and escape, preserving cell viability.

E-L membrane translocation of nanomaterials can be improved changing the shape/surface properties of the nanostructures.^[5,6] Some nanomaterials, such as CNTs, display extraordinary invasive properties, penetrating through many different biological membranes.^[7–13] Moreover, after protein-functionalization CNTs behave as smart nanomaterials interacting with cell surface receptors activating endocytosis,^[9–11,14] being transitorily confined inside endosomes,^[9] and eventually translocating into the cytosolic compartment.^[13,15,16]

Here we test a new hypothesis for the design of a coating system that mimics a viral particle. This synthetic covering allows a controlled, reproducible and viable nano/micrometric particle cytoplasmic invasion using CNTs. Figure 1 depicts the fabrication process of these “viral-mimetic particles” (VMPs) that consist of central spherical fluorescently labelled silica particle cores (*f*-SiO₂) of ~500 nm, externally coated with partially desorbed CNTs (ca. 500–1000 nm) that imitate the viral spike morphology. The fluorescence of the *f*-SiO₂ particles -intact after CNT deposition (Figure S1)- served for intracellular fluorescent particle tracking. As control we used *f*-SiO₂ particles with no CNTs. Similar particles have been reported to undergo receptor-mediated endocytosis and E-L trafficking followed by exocytosis.^[17] Finally, to prompt receptor-mediated endocytosis particles were functionalized with culture medium containing serum proteins as previously described.^[18]

To investigate the interaction of the VMPs with the cell surface and the entry mechanisms we employed two complementary imaging techniques, (i) phase-contrast life cell imaging, and (ii) scanning electron microscopy (SEM). These studies demonstrated VMPs in close contact with the cytoplasmic projections of the cells being actively transported towards the cell body (Figure 2a, Video S1). This movement, known as “surfing” and typical of viral particles, uses the underlying actin cytoskeleton of the cellular cortex to transport viruses towards the cell body prior to endocytosis.^[19]

SEM imaging confirmed the morphological resemblance of the VMPs to many viruses and how, minutes after particle landing on the cell surface, finger-like membranous protrusions -known as filopodia- trapped and embraced the particles (Figures 2b, 2c, arrows). Uncoated particles, on the other hand, were captured by sheet-like membranous extensions -known as lamellipodia- that formed endocytic “cups”.

[a] N. Iturrioz-Rodríguez, E. González-Lavado, Dr. M. L. Fanarraga, Grupo de Nanomedicina-IDIVAL, University of Cantabria, Facultad de Medicina, Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
E-mail: fanarrag@unican.es

[b] E. González-Domínguez, L. Marín-Caba, Dr. B. Vaz, Dr. M. Pérez-Lorenzo, Dr. M. A. Correa-Duarte
Department of Physical Chemistry & Department of Organic Chemistry, Center for Biomedical Research (CINBIO), Southern Galicia Institute of Health Research (IISGS), and CIBERSAM, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain.

[*,#] These authors contributed equally to this work.
Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

COMMUNICATION

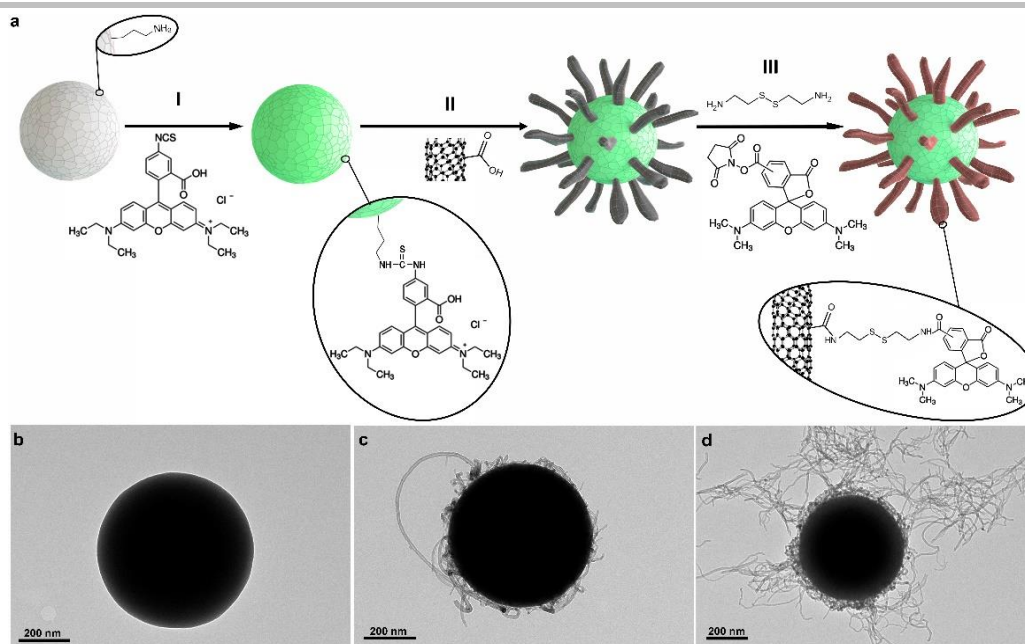


Figure 1. a) Sequential synthetic steps of the VMPs: (I) fluorescent labelling of the SiO_2 uncoated particles ($f\text{-SiO}_2$), (II) deposition of CNTs on VMPs, and (III) 5-TAMRA-VMP fluorescent labelling. TEM images of (b) $f\text{-SiO}_2$ and $f\text{-SiO}_2$ coated with (c) a single, or (d) double CNT coating.

Quantification of particle uptake revealed that, during the first 2 h of exposure, VMPs were internalized by human cells twice as fast as the uncoated $f\text{-SiO}_2$ (30% vs 15%, respectively) (Figure 3a). At this point in time, >95% of the cells contained randomly located intracellular particles. Longer exposure times concentrated the VMPs in the centrosomal region of the cells (Figures 3b, S2).

Interestingly, while VMPs were only occasionally observed extracellularly, a relatively constant number of extracellular uncoated $f\text{-SiO}_2$ particles were detected suggesting a continuous cycle of particle endocytosis-exocytosis. To test this hypothesis, cells were repeatedly washed to remove extracellular particles. *De novo* particle release was observed minutes after cell wash (Figure 3c, Table S1). This experiment proved that the two types of particles underwent different intracellular destinies, supporting a role of the CNT coating in intracellular particle retention.

To document the intracellular routes and destinies for the two types of particles, we used transmission electron microscopy (TEM) on cytoplasmic cell sections. While intracellular $f\text{-SiO}_2$ nude particles were always observed coated with membranes, most VMPs were completely devoid of membranes and fully integrated in the surrounding cytoplasmic environment (Figure S3c). Particle escape to the cytosol was demonstrated using live-cell confocal *time-lapse* microscopy. The process of VMP escape started with the polarization of the particles towards the E-L membrane (Video S2). Particle polarization was concomitant to a progressive E-L contents release indicative of vesicle membrane permeabilization, and preceded particle release to the cytosol (Figure 4a, insets 1-2). Most VMPs were devoid of membranes approximately 72 h after initial cell contact (Figure S4). Interestingly, cell necrosis, apoptosis, or anti-proliferative effects were not detected in cultures days after the treatment with VMPs, thus suggesting the E-L particle escape mechanism was a cell-viable process (Figure S5). TEM imaging served to further confirm

vesicle permeabilization by the CNT coating of the VMPs (Figures 4b, S3c). Many VMPs appeared in the cytosol, some presenting shredded membranes intermingling with the CNTs of their coating.

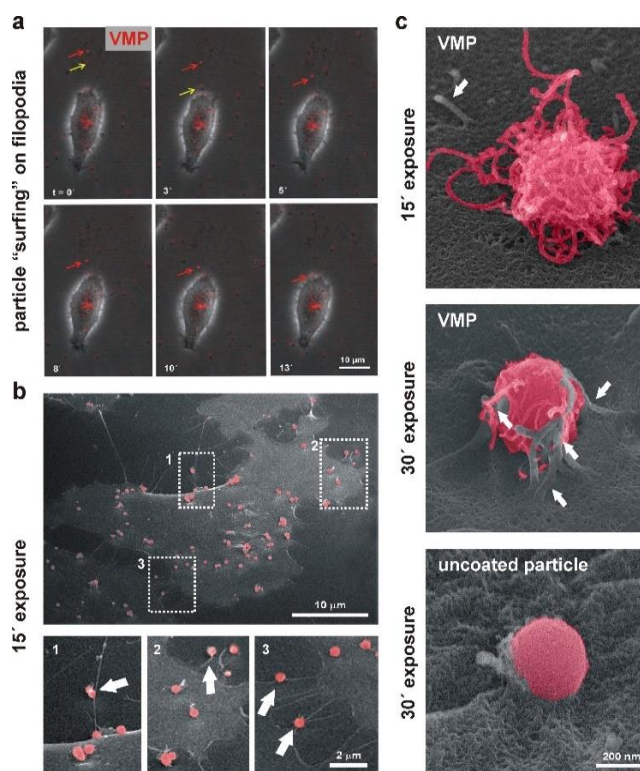


Figure 2. a) VMPs surfing on filopodia (Video S1). Arrows point at VMPs (red fluorescence). b) SEM images of VMPs on human. c) Cell surface contacts with VMPs and $f\text{-SiO}_2$. Arrows point at cell filopodia embracing VMPs. Uncoated particles are captured by lamellipodia. Particles are pseudocoloured in pink.

COMMUNICATION

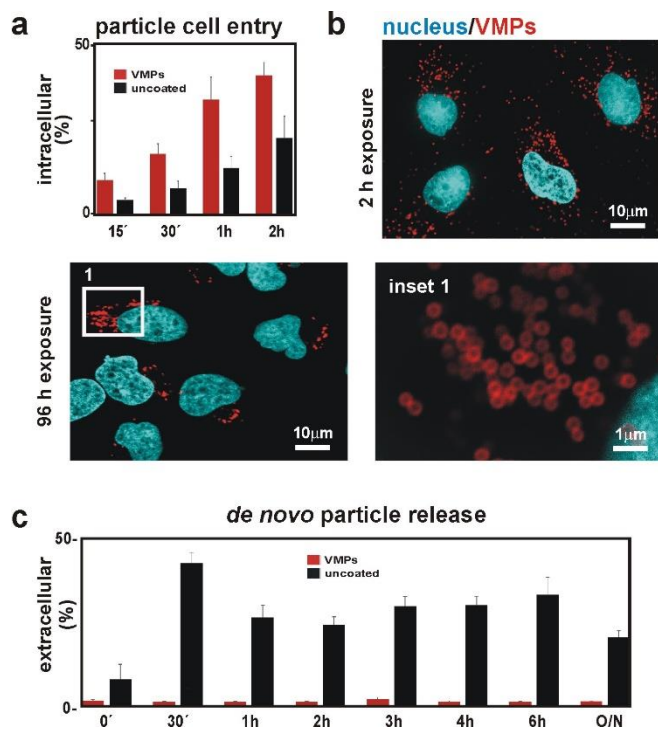


Figure 3. a) Quantification of particle uptake by HeLa cells. All values are significant for a $t > 5$; $p < 10^{-5}$; degrees of freedom $DF = 30$). b) VMPs appear throughout the cell cytoplasm soon after cell contact becoming perinuclear hours after engulfment (red channel). c) Quantification of *de novo* particle release (after cell wash) (Figure S2). All values are statistically significantly $< 5 \times 10^{-3}$; ($DF = 30$) (Table S1). Total intracellular particles at 12 h = 100%.

All these experiments support the idea that this nanotube coating participates in particle escape to the cytosol (i) penetrating, (ii) piercing, and permeabilizing the E-L membranes, (iii) finally destroying the integrity of this subcellular compartment, (iv) allowing VMP release into the cytosol.

To investigate this hypothesis, we used a covalent cystamine linker to decorate the surface of the CNTs with the fluorescent dye 5-TAMRA (Figure 1-III). This would serve to confirm (i) CNT protein biocorona removal, (ii) CNT-dye unlinking, and finally, (iii) lysosomal membrane permeabilization followed by (iv) dye release into the cytoplasm. As it is typical for CNTs, the fluorescence of this dye is virtually quenched when linked to the surface of the nanotube, becoming detectable after exposure to reducing conditions *in vitro* (Figure S6). The E-L lysosomal reducing conditions *in vivo* [1,2,20] permitted dye fluorescence detection in the cytoplasm of HeLa cells 24 h after 5-TAMRA-CNT endocytosis. Likewise, cells treated with 5-TAMRA-VMPs presented a patent cytoplasmic 568 nm fluorescent emission 24 h after VMP uptake (Figure S7). These results confirm CNT protein stripping and E-L membrane permeabilization as part of the mechanism of VMP escape into the cytosol.

As is the case for the viral-surface spike proteins, CNT protein removal in the lysosomes would change the surface properties of these nanofilaments, exposing the apolar/hydrophobic regions of the nanotubes. This modification enhances their affinity for the E-L lipidic membranes, triggering membrane penetration, perforation, permeabilization and ultimately, VMP release into the cytosol. These steps in the VMP escape reproduce the stages of

viral translocation into the cytoplasm (Figure 5). Lipid tail protrusions have also been shown to mediate the insertion of gold nanoparticles into model cell membranes.^[21]

Summarizing, here we describe the internalization and escape route of a new synthetic particle-coating as a model for the fabrication of future nanostructured materials destined for different applications in the cytosolic or nuclear realms. The design of the CNT coating allows mimicking the viral cellular uptake as well as the exceptional ability of these microorganisms to escape from the E-L into the cytosol without affecting the viability of the host cells. Given that, this strategy of cytoplasm particle invasion based on artificial nano-coatings is applicable to a wide range of morphologies from the nanometer to the micrometer scale, including hollow, porous and solid geometries. Thus, this design constitutes an extraordinary tool for the modelling of therapeutic architectures. In line with this, it is of special relevance the administration of therapies that involve biodegradable biomolecules such as proteins and/or nucleic acids. Furthermore, these structures allow endless design modifications, for instance, incorporating materials endowed with magnetic, optical or catalytic functionalities, which can expand the applications of these VMPs beyond drug delivery.

In addition, the significantly enhanced surface provided by the CNT-coating -that can be bioconjugated with many different ligands-, together with the cytosolic escape mechanisms serve to drive these VMPs to target cells, providing a unique methodology for the study of many still unexplored intracellular processes within the cell. These features, together with the fact that these engineered nanocoatings can be implemented in almost any carrier to enable E-L escape represent a great added value as a technological development in nanobiotechnology.

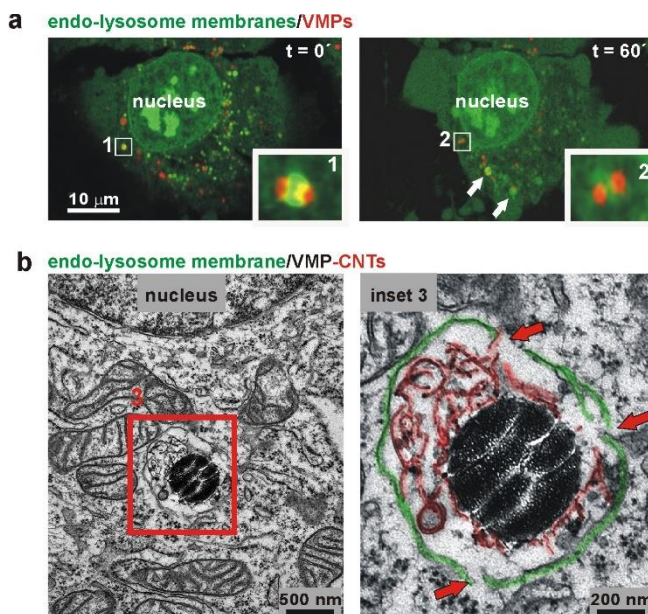
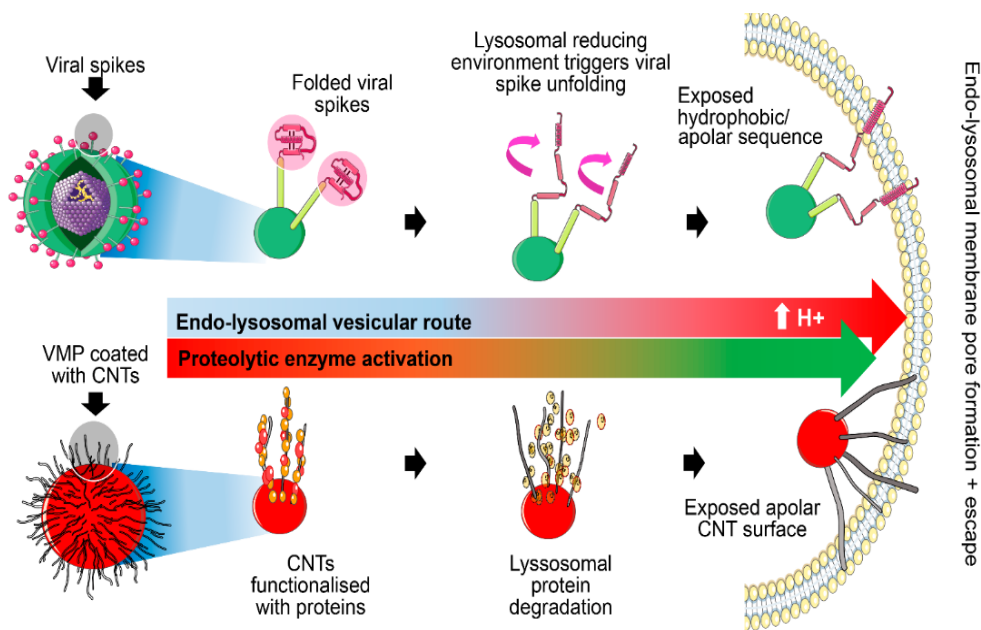


Figure 4. a) Photographs of video S2 demonstrating VMP escape from the E-L membranes. Insets show two VMPs (red channel) inside an E-L and the release of the endosomal contents prior particle escape. b) TEM images of a section of a HeLa cell displaying healthy mitochondria surrounding a permeabilized E-L containing a VMP. The CNTs of the VMP coating (pseudo-coloured in red) are observed in close contact, or piercing, the E-L membrane (green) (red arrows).

COMMUNICATION

Figure 5. Similarities between viral (green) and VMPs (red) escape mechanisms. (Top) The changing E-L acidic and reducing environment^[1,2,20] triggers hydrogen bond release, viral spike protein unfolding, and exposure of hydrophobic protein domains (pink) that penetrate the membranes of the E-L forming small pores that allow the controlled lysosomal contents release, and finally, viral escape into the cytosol; (Bottom) Proteins decorating the VMP CNT biocorona undergo proteolysis in lysosomes^[22] exposing the stripped CNT surface that interacts with the E-L membranes, forming small pores that eventually release the particles into the cytosol.^[1,2,20]



Acknowledgements

We are grateful to IDIVAL Institute and to L. García-Hevia, J.C. Villegas and I. Casafont for technical assistance with microscopy. This work has been supported by the Spanish MINECO Project Refs. PI13/01074, PI16/00496 and CTM2014-58481-R, IDIVAL INNVAL15/15, Xunta de Galicia (Centro Singular de Investigación de Galicia-Accreditation 2016-2019 and EM2014/035, European Regional Development Fund (ERDF), Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno.

Keywords: particle release, CNT, endocytosis, lysosomal permeabilization, cytoplasmic invasion.

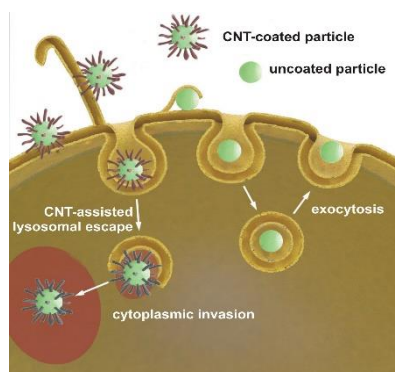
- [1] J. M. Kinchen, K. S. Ravichandran, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 781–95.
- [2] J. B. Lloyd, *Biochem. J.* **1986**, *237*, 271–2.
- [3] H. K. Shete, R. H. Prabhu, V. B. Patravale, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 460–74.
- [4] J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 803–833.
- [5] N. A. Kotov, *Science* **2010**, *330*, 188–189.
- [6] Z. Chu, S. Zhang, B. Zhang, C. Zhang, C.-Y. Fang, I. Rehor, P. Cigler, H.-C. Chang, G. Lin, R. Liu, et al., *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3050–3061.
- [7] Q. Mu, D. L. Broughton, B. Yan, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4370–4375.
- [8] A. Albin, V. Mussi, A. Parodi, A. Ventura, E. Principi, S. Tegami, M. Rocchia, E. Francheschi, I. Sogno, R. Cammarota, et al., *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 277–288.
- [9] L. Lacerda, J. Russier, G. Pastorin, M. A. Herrero, E. Venturelli, H. Dumortier, K. T. Al-Jamal, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3334–3343.
- [10] P. N. Yaron, B. D. Holt, P. A. Short, M. Lösche, M. F. Islam, K. N. Dahl, *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 1–15.
- [11] K. Maruyama, H. Haniu, N. Saito, Y. Matsuda, T. Tsukahara, S. Kobayashi, M. Tanaka, K. Aoki, S. Takanashi, M. Okamoto, et al., *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 793186.
- [12] X. Shi, A. von dem Bussche, R. H. Hurt, A. B. Kane, H. Gao, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 714–719.
- [13] K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsivilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J.-P. Briand, S. Muller, et al., *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 108–113.
- [14] Q. X. Mu, D. L. Broughton, B. Yan, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4370–4375.
- [15] L. Rodriguez-Fernandez, R. Valiente, J. Gonzalez, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6614–6625.
- [16] L. Garcia-Hevia, R. Valiente, J. L. Fernandez-Luna, E. Flahaut, L. Rodriguez-Fernandez, J. C. Villegas, J. Gonzalez, M. L. Fanarraga, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1640–1644.
- [17] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, Y. Zhao, K. Kandel, C. Peerapattit, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Small* **2011**, *7*, 1526–1532.
- [18] E. González-Domínguez, N. Iturriz, E. Padín-González, J. C. Villegas, L. García-Hevia, M. Pérez-Lorenzo, W. J. Parak, M. A. Correa-Duarte, M. L. Fanarraga, *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 6317–6328.
- [19] M. J. Lehmann, N. M. Sherer, C. B. Marks, M. Pypaert, W. Mothes, *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 317–325.
- [20] B. Arunachalam, U. T. Phan, H. J. Geuze, P. Cresswell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 745–750.
- [21] R. C. Van Lehn, M. Ricci, P. H. J. Silva, P. Andreozzi, J. Reguera, K. Voitchovsky, F. Stellacci, A. Alexander-Katz, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4482.
- [22] P. Bohley, P. O. Seglen, *Experientia* **1992**, *48*, 151–157.

COMMUNICATION

Entry for the Table of Contents

COMMUNICATION

Escaping the lysosomal membranes: An engineered nanocoating composed of CNTs enables a life-compatible nano/micrometric particle invasion into the intracellular realm.



N. Iturrioz-Rodríguez, E. González-Domínguez, E. González-Lavado, L. Marín-Caba, B. Vaz, M. Pérez-Lorenzo, M. A. Correa-Duarte and M. L. Fanarraga

Page No. – Page No.
A synthetic getaway biomimetic strategy for cytoplasm particle invasion

Potassium-Ion-Selective Fluorescent Sensors To Detect Cereulide, the Emetic Toxin of *B. cereus*, in Food Samples and HeLa Cells

José García-Calvo,^[a] Saturnino Ibeas,^[a] Eva-Clara Antón-García,^[a] Tomás Torroba,^{*,[a]} Gerardo González-Aguilar,^[b] Wilson Antunes,^[c] Eloísa González-Lavado,^[d] and Mónica L. Fanarraga^{*,[d]}

This paper is dedicated to the memory of the late Dr. Stefano Marcaccini

We report the development of new chemical probes for cereulide, a toxic metabolite produced by specific strains of *Bacillus cereus*, through displacement of potassium cations from a pre-formed specific complex and a subsequent change in the fluorescence emission. For this purpose, we designed fluorescent probes for potassium cations that were suitable for displacement assays with cereulide from organic extracts. The fluorescence detection of natural cereulide in rice samples was achieved by using synthetic cereulide as a reference and a potassium fluorescent reporter, and this was found to be useful as

a portable and fast method for the in situ detection of cereulide in food extracts. To study the fate of cereulide in live cells, we designed a procedure that was suitable for live-cell microscopy imaging of HeLa cells by comparing the cellular location of the potassium fluorogenic probe, which stained intracellular endolysosomes, in the absence and presence of cereulide; we concluded that in the presence of cereulide, the fluorescence of the probe was decreased because of complexation of the potassium ions by cereulide.

1. Introduction

Cereulide is an ionophore toxin produced by specific strains of *Bacillus cereus*.^[1] *B. cereus* causes two different types of food disease: diarrheal and emetic syndrome.^[2] The diarrheal form is developed after the ingestion of food contaminated with spores or vegetative cells able to produce enterotoxins during vegetative growth in the small intestine. The emetic syndrome is usually associated with the ingestion of foodstuffs contami-

nated with the preformed toxin, cereulide, produced during the growth of bacteria in food;^[3] therefore, intoxication with cereulide could be prevented by the early detection of the toxin in food. *B. cereus* can produce highly resistant structures called endospores, which are capable of surviving to cooking temperatures. *Bacillus* endospores present in foodstuffs can rapidly germinate and produce their toxins, especially during food chilling or food heating.^[4] *B. cereus* is a ubiquitous agent in nature, and their spores can be found as a natural contaminant in several food products, especially meats, vegetables, and milk.^[5] The emetic syndrome is generally associated with rice or other starch-rich products such as pasta and potato-based products.^[6] The emetic toxin is a cyclic depsipeptide^[7] with the structure [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃, which is closely related to the structure of valinomycin, another naturally occurring cyclic depsipeptide and potassium-cation ionophore with the tetramer structure D- α -hydroxyisovaleryl-D-valyl-L-lactyl-L-valyl [D-O-Hyi-D-Val-L-O-Lac-L-Val]₃ (Figure 1).^[8] The cer-

[a] J. García-Calvo, Dr. S. Ibeas, E.-C. Antón-García, Prof. T. Torroba
Department of Chemistry, Faculty of Science
University of Burgos, 09001 Burgos (Spain)
E-mail: ttorroba@ubu.es

[b] Dr. G. González-Aguilar
Centre for Applied Photonics, INESC TEC
Rua do Campo Alegre, Dpto. Física 4169-007 Porto (Portugal)

[c] Dr. W. Antunes
Laboratório de Bromatologia e de Defesa Biológica (LBDB) do Exército
Av. Dr. Alfredo Bensaúde, 1849-012 Lisboa (Portugal)

[d] E. González-Lavado, Prof. M. L. Fanarraga
Grupo de Nanomedicina-IDIVAL
Universidad de Cantabria, Santander 39011 (Spain)
E-mail: monica.lopez@unican.es

Supporting Information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/open.201700057>.

© 2017 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

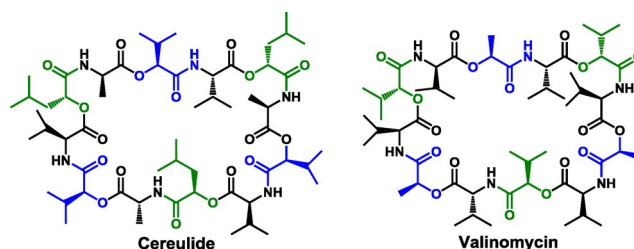
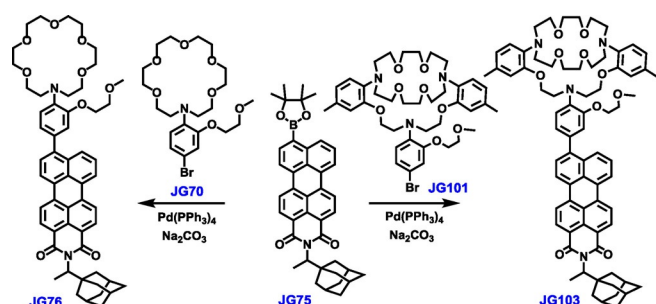


Figure 1. Chemical structures of cereulide and valinomycin.

eulide toxin is usually identified by liquid chromatography and mass spectrometry, which require dedicated facilities.^[9] Cereulide acts as a potassium-cation ionophore and is able to disrupt the transmembrane potential in mitochondria of eukaryotic cells; this leads to mitochondrial degeneration and subsequently to cell death.^[10] Owing to cereulide toxicity, rapid and portable detection methods to screen the presence of pre-formed toxin in foodstuffs are required to prevent the occurrence of food-borne outbreaks by emetic toxin.

2. Results and Discussion

Fluorescent probes are a good alternative for the detection of toxins or chemical threats.^[11] Owing to the ability of cereulide to complex potassium cations, a suitable method for its detection from extracts of biological or food samples should be a displacement mechanism of the potassium cation from a pre-formed specific complex that would give rise to a change in the fluorescence emission. Following this idea, we designed a fluorescent probe for potassium that is suitable for displacement assays with cereulide in organic solvents. Because cereulide is not soluble in water, a requisite of the fluorogenic probe is that it have good performance in organic or mixed organic–aqueous solvents. Therefore, we selected a perylenemoimide as the fluorescent reporter^[12] and a K^+ -selective phenylaza[18]crown-6-lariat-ether^[13] or a triazacryptand^[14] as the recognition units and bonded both moieties in every case by Suzuki coupling (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of JG76 and JG103.

With the simpler and more accessible JG76 fluorescent probe, we designed the fluorescence displacement assays on the basis of Figure 2. The displacement assays were initially performed by using commercial valinomycin instead of less-available cereulide. In this way, the JG76 probe was weakly fluorescent in ethanol, but in the presence of a potassium chloride solution, a dramatic increase in the fluorescence was observed owing to potassium-ion complexation. As expected, by the addition of a valinomycin solution, the previous solution became weakly fluorescent. The differences in fluorescence are described in Figure 2b.

On the other hand, probe JG103 showed very low solubility in ethanol and a very small increase in the fluorescence in the presence of potassium cations in all of the tested solvents; therefore, we considered that its utility for the detection of cer-

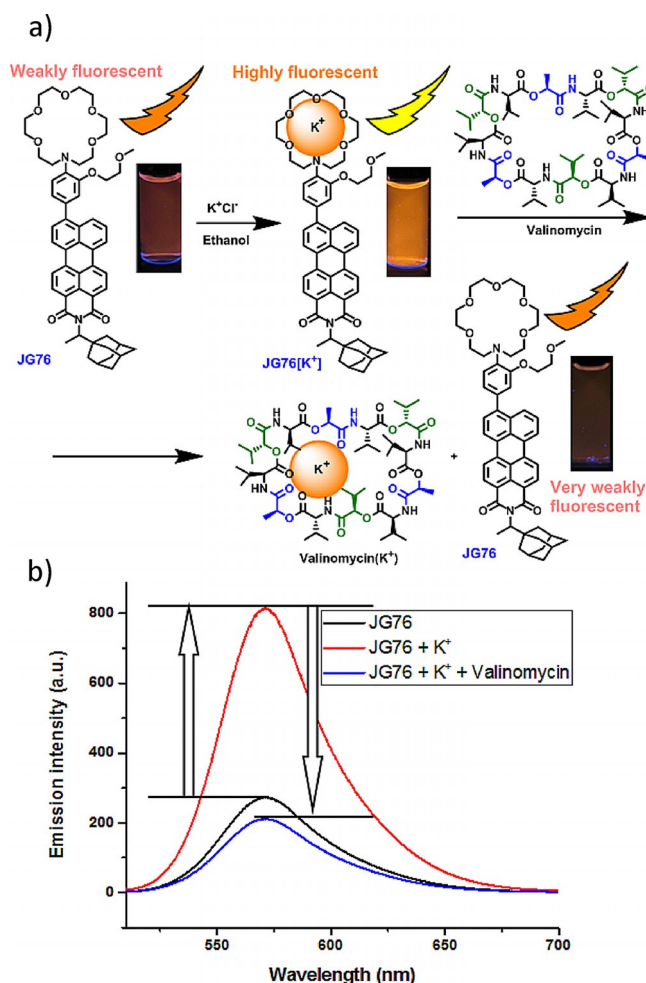


Figure 2. a) Qualitative and b) quantitative fluorescence displacement assays of JG76, potassium cations, and valinomycin.

eulide was very limited and its study was discontinued. Potassium cations are usually mixed with other ions in biological samples, so we checked carefully the action of diverse cations and anions that could interfere in the displacement assays with JG76. With respect to alkali-metal and alkaline-earth metal cations, the JG76 probe showed a large increase in fluorescence in the presence of potassium cations with total selectivity with respect to commonly found physiological cations (i.e. Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , and NH_4^+) as well as less-common, albeit physiological cations (i.e. Sr^{2+} , Rb^+ , Cs^+) but also showed a large increase in fluorescence in the presence of the highly toxic Be^{2+} and Ba^{2+} cations, which are not normally found in biological fluids (Figure 3) except in toxicological assays, for which the JG76 probe could be of interest.

The assays were performed by dissolving compound JG76 in EtOH to a concentration of 50 μM and the cations in water to a concentration of 5 mM; then, the cation solution (10 μL) was added to the JG76 solution (0.5 mL), and changes in the color and fluorescence were studied. With respect to heavy-metal cations, some acidic cations such as Sn^{2+} and Pb^{2+} showed a high increase in fluorescence in the presence of JG76, and to a lesser extent, some other cations, including Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ,

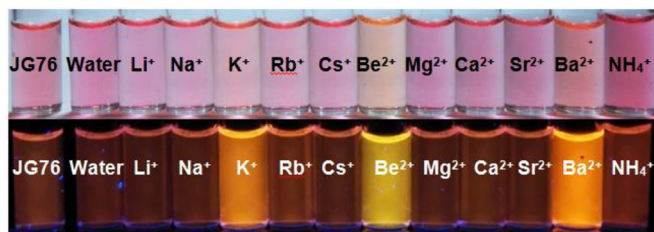


Figure 3. Color and fluorescence assays of JG76 and alkali-metal and alkali-earth metal cations (1 equiv).

Sc^{3+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Au^{3+} , and Pd^{2+} , also showed an increase in fluorescence under the same conditions (Figure 4) and in the presence of a large excess amount of strong acids ($\text{pH} < 5$) or oxidants. None of the common anions [i.e. F^- , Cl^- , Br^- , I^- , BzO^- ($\text{Bz} = \text{benzoyl}$), NO_3^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , AcO^- , CN^- , SCN^-] gave a significant change in color or fluorescence (see the Supporting Information, Figure S98).

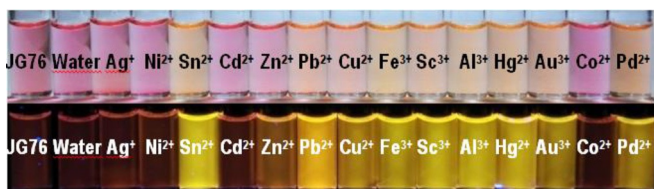


Figure 4. Color and fluorescence assays of JG76 and selected heavy-metal cations (1 equiv).

In a pH 7 buffered solution [JG76, 25 μM in EtOH/ H_2O (7:3 v/v), 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)], most of the interferent cations including Fe^{3+} , Sn^{2+} , Be^{2+} , and Cu^{2+} (5 equiv) did not promote a change in the fluorescence of JG76, but the sensitivity to K^+ , Ba^{2+} , and Pb^{2+} remained unchanged, and they showed a high increase in the fluorescence of JG76; therefore, the only real interferents were the nonphysiological Ba^{2+} and Pb^{2+} cations (Figure 5).

Job's plot analysis, by representing $X_{\text{JG76}}(F_0 - F)$ versus X_{JG76} (where X_{JG76} = mole fraction of JG76), afforded the stoichiometry of the complex, from the maximum position at $X_{\text{JG76}} = 0.5$, as a 1:1 complex. The calculated quantum yield of the JG76 probe in ethanol is $\Phi[\text{JG76}] (\text{EtOH}) = 0.04 \pm 0.01$ and for the corresponding potassium complex, $\Phi[\text{JG76}-\text{K}^+] (\text{EtOH}) = 0.17 \pm 0.01$; the increase is $\Phi/\Phi_0 = 4$, which is sufficient for the experimental assays. The lifetime of JG76 in EtOH was found to be 3.6 ns, and there was no change in the lifetime for the potassium complex. The limit of detection for K^+ , obtained by linear regression of a titration of a 5 μM solution of JG76 in EtOH and K^+ by increasing the K^+ concentration from 0.01 to 0.2 μM and by measuring the increase in the fluorescence emission, was calculated as 0.06 μM , with a probability of false positive and false negative lower than 5%. The JG76- K^+ complex was studied by preparing a 2 μM solution of $\text{K}(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ in EtOH and by increasing the concentration of JG76 from 0 to 10 μM without changing the concentration of K^+ in solution. The equilibrium constant (K) of the JG76- K^+ complex was cal-

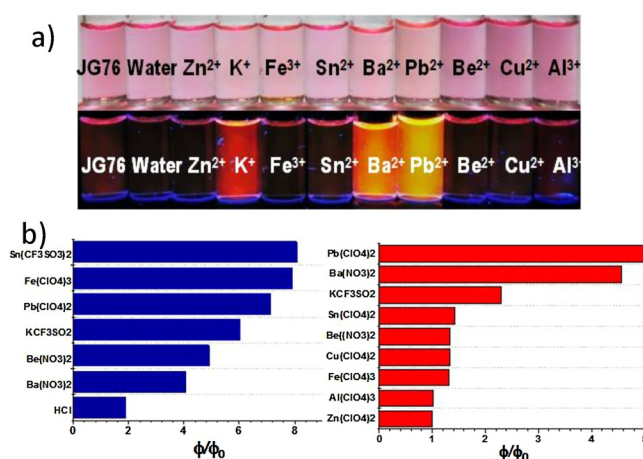


Figure 5. a) Color and fluorescence assays of JG76 and selected cations in a buffered pH 7 solution. b) Quantitative fluorescence assays of JG76 and selected cations in ethanol (left) and a buffered pH 7 solution (right).

culated by fitting the fluorescence titration plot in ethanol by nonlinear least-square regression; the results were compared by performing first the titration of K^+ with JG76 and then that of JG76 with K^+ , and the same results were obtained. The fitting calculation of the complexation constants was repeated three times to give $\log K (\text{JG76} + \text{K}^+) = 6.34 \pm 0.04$. To validate the results, Job's plot analysis and the equilibrium constant of the JG76- K^+ complex were also studied and calculated in benzyl alcohol, BnOH, and comparable results were obtained: a 1:1 complex and $\log K (\text{JG76}-\text{K}^+) = 6.11 \pm 0.03$ (Figure 6). We next checked the suitability of the system for the practical detection of valinomycin by calculating the limit of detection of valinomycin in ethanol. Therefore, 0.75 equivalents of K^+ CF_3SO_3^- was added to a 5 μM solution of JG76 in ethanol. Then, the concentration of valinomycin was increased by successive additions, and the fluorescence spectrum was registered. Regression of the titration plot of 5 μM JG76 and 3.75 μM K^+ in EtOH with valinomycin by decreasing the fluorescence emission gave a detection limit of 0.54 μM , with

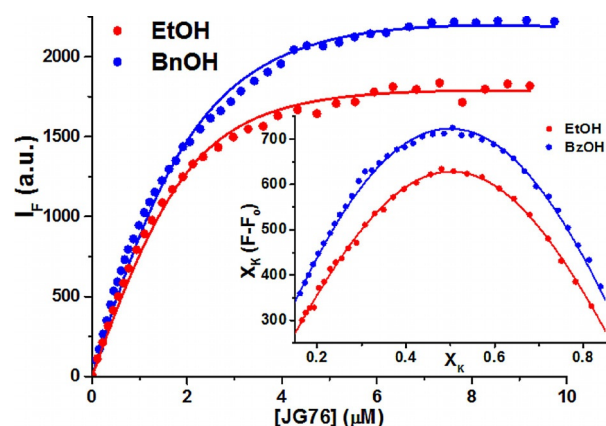
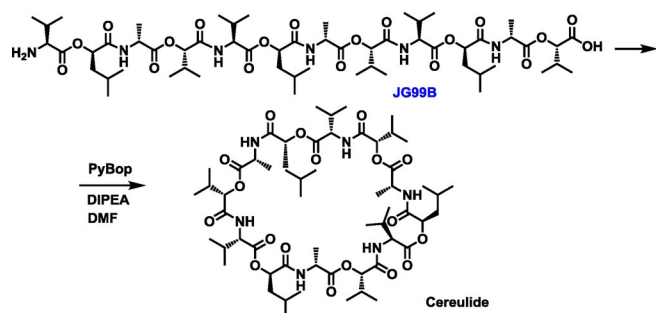


Figure 6. Fitted titration plot of a 2 μM solution of K^+ and JG76 by fluorescence emission in EtOH and BnOH. Inset: Job's plot of JG76 and K^+ by fluorescence emission in EtOH and BnOH.

a probability of false positive and false negative lower than 5% (see Figure S123).

The JG76 fluorescent probe was then ready for titration with synthetic cereulide, which was prepared according to the procedure of Biesta-Peters et al.^[15] The last step, consisting of the cyclization of the linear H-(L-Val-D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val)-OH depsipeptide, is shown in Scheme 2.



Scheme 2. Cereulide synthesis.

Purified cereulide was checked by NMR spectroscopy and HRMS (MALDI), and the results were identical to the reported data of cereulide. We first checked the suitability of the system for the practical detection of synthetic cereulide by calculating the limit of detection of cereulide in ethanol. In an experiment similar to that previously explained, $K^+CF_3SO_3^-$ (0.75 equiv) was added to a $5\ \mu\text{M}$ solution of JG76 in ethanol. Then, the concentration of cereulide was increased by successive additions, and the fluorescence spectrum was registered. Regression of the titration plot of $5\ \mu\text{M}$ JG76 and $3.75\ \mu\text{M}$ K^+ in EtOH with cereulide by decreasing the fluorescence emission gave a detection limit of $0.21\ \mu\text{M}$, with a probability of false positive and false negative lower than 5% (Figure 7); in this case, the detection limit for cereulide was lower than the value obtained for valinomycin.

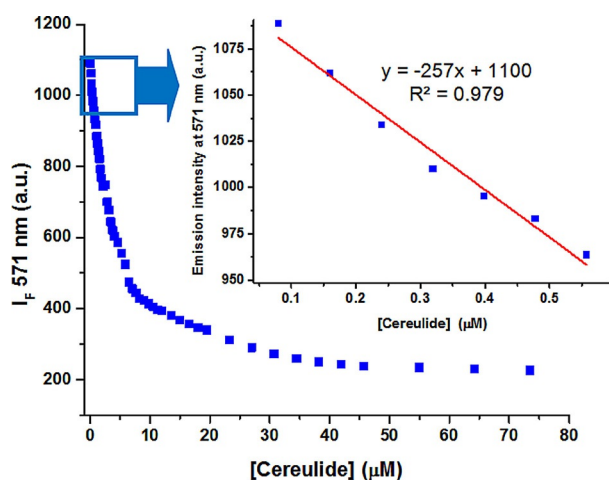


Figure 7. Linear regression of the titration plot of $5\ \mu\text{M}$ JG76 and $3.75\ \mu\text{M}$ K^+ in EtOH with increasing amounts of cereulide by decreasing the fluorescence emission of the system.

A complete description of the system was then performed by calculating the equilibrium constants between valinomycin/cereulide and the potassium cations in competitive equilibria with JG76, for which we previously obtained the binding constants. Equilibrium constants were first measured in EtOH solution by increasing the concentration of the probe in the presence of the analyte. We performed titrations of constant concentrations of $2\ \mu\text{M}$ K^+ and $20\ \mu\text{M}$ valinomycin or cereulide with JG76 (0 to $20\ \mu\text{M}$). In the case of valinomycin, the experiment started with solutions of valinomycin (V) and potassium cations (K) in ethanol so that the complex (VK) was produced in the equilibrium. Upon adding the JG76 probe (abbreviated S), it formed a complex with free K^+ and created a new complex (SK) and replaced the previous complex (VK). In this way, the concentration of VK decreased, whereas the concentration of V increased. The fluorescence intensity only depended on JG76 and the JG76–potassium complex. To solve the equations corresponding to the system, a possible approximation could be done, $C_V - [VK] \approx C_V$ in which C_V is the concentration of valinomycin, and this simplification is more realistic if the initial ratio of V/K is as high as possible. In this way, an equation to describe the equilibria was obtained [Eqs. (1)–(5)]:

$$S + K \xrightleftharpoons{K_1} SK \quad (1)$$

$$V + K \xrightleftharpoons{K_2} VK \quad (2)$$

$$K_1 = \frac{[SK]}{[S][K]} = \frac{[SK]}{(C_S - [SK])(C_K - [SK] - [VK])} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{[VK]}{[V][K]} = \frac{[VK]}{(C_V - [VK])(C_K - [SK] - [VK])} \quad (4)$$

$$[SK] = \frac{\left(C_S + C_K + \frac{1+K_2C_V}{K_1}\right) - \sqrt{\left(C_S + C_K + \frac{1+K_2C_V}{K_1}\right)^2 - 4C_SC_K}}{2} \quad (5)$$

in which C_S , C_K , and C_V are the concentrations of JG76, K^+ , and valinomycin, respectively.

By taking into account the mass and fluorescence balances for all equilibria and performing the tests several times with different initial ratios of V/K (1:1, 1:0.25, and 1:0.1), the best fitting of the obtained equation was found at a 1:0.1 ratio, at which the approximation was most valid. By alternating the concentrations of valinomycin and cereulide in several experiments, fitted titration plots were obtained for both valinomycin and cereulide in EtOH and BnOH (Figure 8).

From the average of the three titrations, we obtained the following complexation equilibrium constants: $\log K$ (valinomycin- K^+ , EtOH) = 5.97 ± 0.01 , $\log K$ (valinomycin- K^+ , BnOH) = 4.98 ± 0.01 , $\log K$ (cereulide- K^+ , EtOH) = 5.99 ± 0.01 , K (cereulide- K^+ , BnOH) = 5.01 ± 0.01 . With the values of K_2 and K_1 , the concentration of $[SK]_{eq}$ could be determined, and with these data the concentration of the species was calculated by using Equations (6)–(9). With the data previously obtained, the amounts of reagents and the proportion of the complex existing during the titration could be represented (Figure 9).

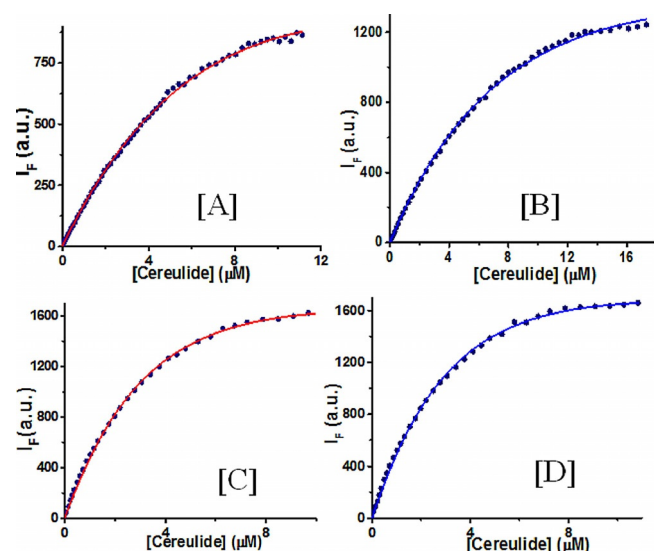


Figure 8. Fitted titration plots by fluorescence emission of 2 μM solutions of $\text{K}(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ and a 20 μM solution of valinomycin or cereulide with JG76 in EtOH and BnOH: a) K^+ , valinomycin, and JG76 in EtOH; b) K^+ , valinomycin, and JG76 in BnOH; c) K^+ , cereulide, and JG76 in EtOH; d) K^+ , cereulide, and JG76 in BnOH.

$$[\text{S}]_{\text{eq}} = C_{\text{S}} - [\text{SK}]_{\text{eq}} \quad (6)$$

$$[\text{VK}]_{\text{eq}} =$$

$$\frac{C_{\text{V}} + C_{\text{K}} - [\text{SK}]_{\text{eq}} + \frac{1}{K_2} \sqrt{\left(C_{\text{V}} + C_{\text{K}} - [\text{SK}]_{\text{eq}} + \frac{1}{K_2}\right)^2 - 4C_{\text{V}}(C_{\text{K}} - [\text{SK}]_{\text{eq}})}}{2} \quad (7)$$

$$[\text{V}]_{\text{eq}} = C_{\text{V}} - [\text{VK}]_{\text{eq}} \quad (8)$$

$$[\text{K}]_{\text{eq}} = C_{\text{K}} - [\text{SK}]_{\text{eq}} - [\text{VK}]_{\text{eq}} \quad (9)$$

To validate the method, we calculated the binding constant of valinomycin with potassium cations by circular dichroism following the reported methodology.^[16] Starting with a concentration of 30 mM of valinomycin in EtOH, the concentration of the potassium cations was gradually increased up to 3.75 equivalents. This concentration of valinomycin was selected because of the optimal concentration to follow changes in the dichroism signal, albeit it is too high to perform safe measurements with toxic cereulide. By checking the fitting at different wavelengths, the value of the constant appeared to be different depending on the value of the wavelength selected. Within the $\lambda = 230\text{--}250$ nm range (at $\lambda = 238$ nm the obtained $\log K = 5.82$ value was similar to that previously reported), the calculated range of values for the complexation constant was $\log K(\text{valinomycin}-\text{K}^+, \text{EtOH}) = 5.8\text{--}6.0$, which is compatible with the values obtained by fluorescence assays. Therefore, the developed methodology was validated as a means to study the fluorescence detection of cereulide from natural samples. To accomplish this objective, the proposed method involved the competition between cereulide and the JG76 probe for potassium. Extraction of natural cereulide was performed on cultures of *B. cereus* F4810/72 by following the methodology de-

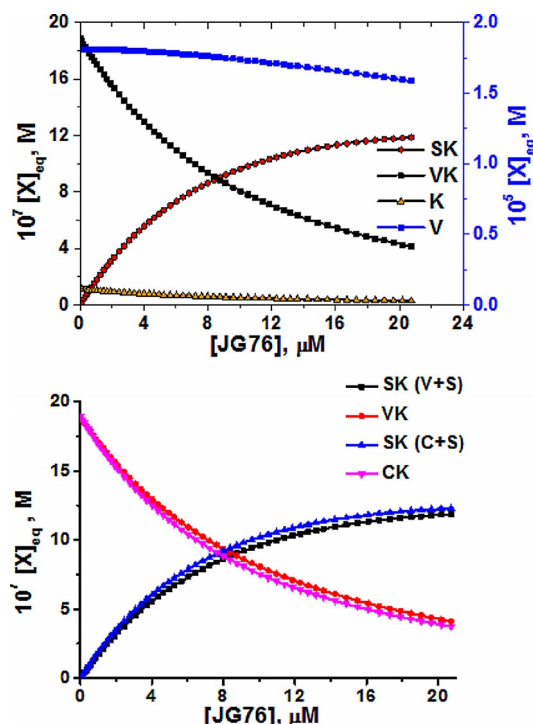


Figure 9. Concentrations in equilibrium in EtOH solution. Top) V (valinomycin), VK (valinomycin- K^+), K (K^+), and SK ($\text{JG76}-\text{K}^+$) in equilibrium. Bottom) comparison of the concentrations of the complexes corresponding to valinomycin and cereulide and CK (cereulide- K^+) in equilibrium.

veloped for cooked rice,^[17] which consisted of inoculation of rice with 300 CfU (average value found in rice dishes). CfU was determined at several time points, and cereulide production was checked at several time points by MS (UPLC-TOF). We measured the change in fluorescence in the presence of a constant concentration of the probe, a constant concentration of potassium, and an unknown concentration of the cereulide sample (usually within the range of 0.2 to 3.5 μM in acetonitrile), which we titrated with synthetic cereulide. Initial acetonitrile extracts were evaporated, the residue was extracted into dichloromethane/water and concentrated, and the obtained solid was dissolved in EtOH so that the interference of water-soluble interferents was prevented. The EtOH solution was checked by MS (UPLC-TOF) by studying the elution time of synthetic cereulide, and the LC-MS of the extracted cereulide samples were measured and calibrated with synthetic cereulide at different concentrations. In this way, the concentration of the cereulide samples from rice remained between 1.2 and 1.6 μM [as determined by MS (UPLC)]. We then measured the background fluorescence due to the matrix of the sample. We performed a preliminary titration of the sample with JG76 to assure that the background fluorescence was a constant value independent of the amount of JG76 (Figure 10).

With the extracted cereulide samples we measured variations in the emission signal by subtracting the background fluorescence of the matrix, measured before adding JG76, and titrated the samples with synthetic cereulide in the presence of JG76 (2 μM) and K^+ (0.75 μM). With this titration we ob-

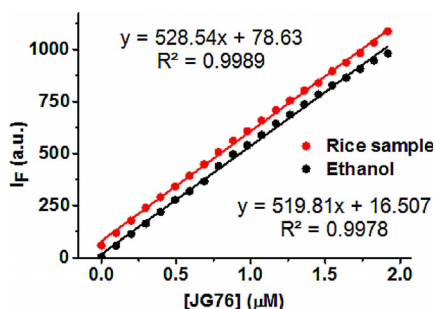


Figure 10. Comparison between ethanol and rice sample solutions upon increasing the JG76 concentration. The background fluorescence was a constant value of 77 au.

served that the first points of the rice sample titration deviated from those of the reference due to the quantity of natural cereulide present in the sample; therefore, from the initial values of fluorescence we obtained the original concentration of natural cereulide in the sample by comparison with the reference plot from synthetic cereulide (Figure 11). The result of repeat-

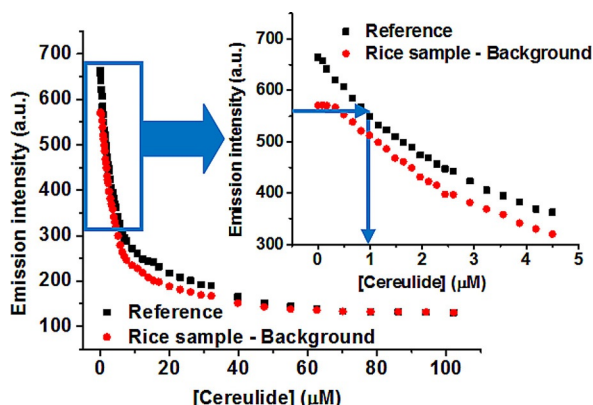


Figure 11. Fluorescence emission of a corrected sample versus the reference by titration with increasing quantities of cereulide. The concentration of JG76 was 2 μM , and the concentration of K^+ was 0.75 μM . The concentration of cereulide in the rice sample was 0.95 μM .

ing the test three times was $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{M}$ for rice samples compared to the concentration of 1.2 μM obtained by mass spectrometry. In the case of a sample spiked with 1.75 μM cereulide, the result of the fluorescence titration was in accordance with the expected value (Figure 12). If there was no initial cereulide in the sample, the curves were coincident (Figure 13).

Indeed, the measurements were more precise for the samples spiked with synthetic cereulide than for the samples containing natural cereulide, which is due to the fact that natural samples have more than one type of cereulide.^[18] The existence of a mixture of natural cereulides (isocereulides) introduces some uncertainty in the experimental measurements, because their potassium-ion-complexation constants are not known. The fluorescence detection of natural cereulide in rice samples by using synthetic cereulide and a potassium fluorescent reporter is therefore a useful, portable, and fast method

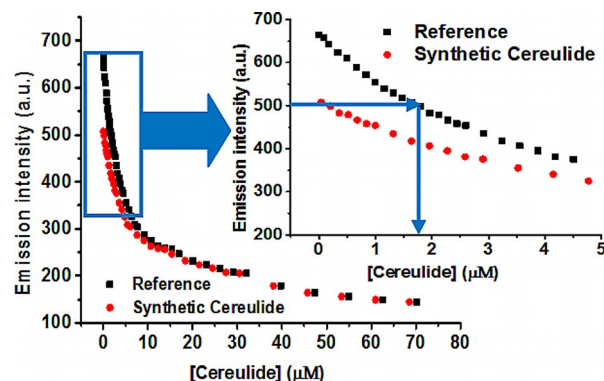


Figure 12. Fluorescence emission of a rice sample spiked with 1.75 μM cereulide versus the reference by titration with increasing quantities of cereulide. The concentration of JG76 was 2 μM , and the concentration of K^+ was 0.75 μM .

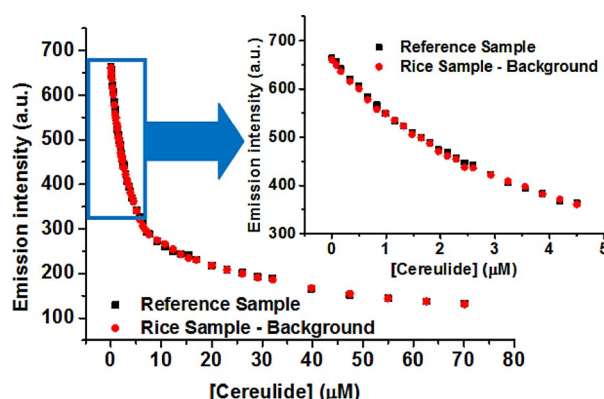


Figure 13. Fluorescence emission of a rice sample with no cereulide versus the reference by titration with increasing quantities of cereulide. The concentration of JG76 was 2 μM , and the concentration of K^+ was 0.75 μM .

for the in situ detection of cereulide by simple extraction and fluorescence titration of the sample. In the case of positive detection, the method can be complemented by standard methodology involving LC-MS for more accurate analysis. Taking into account that a LC-MS (Q-TOF) instrument is not a cheap or portable device relative to a benchtop fluorometer, the reported method may easily prevent the occurrence of foodborne outbreaks by emetic toxin by in situ detection of cereulide.

Another interesting aspect of cereulide detection is visualization of the action of cereulide in live cells. For this purpose, we performed cellular localization studies in HeLa cells (human cervical carcinoma cells) with the JG76 fluorogenic probe. HeLa cells, cultured under standard conditions,^[19] were incubated with the probe (18 μM in 1% v/v DMSO/culture medium). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde before taking images. The nuclei of the fixed cells were stained with Hoechst dye (bisbenzimidazole) before high-resolution confocal microscopy imaging was performed. All confocal cell images were pseudocolored (Figure 14). After exposure for 12 h, the probe stained intracellular vesicular structures that resembled endolysosomes (Figure 14, top). After exposure for 24 h, the

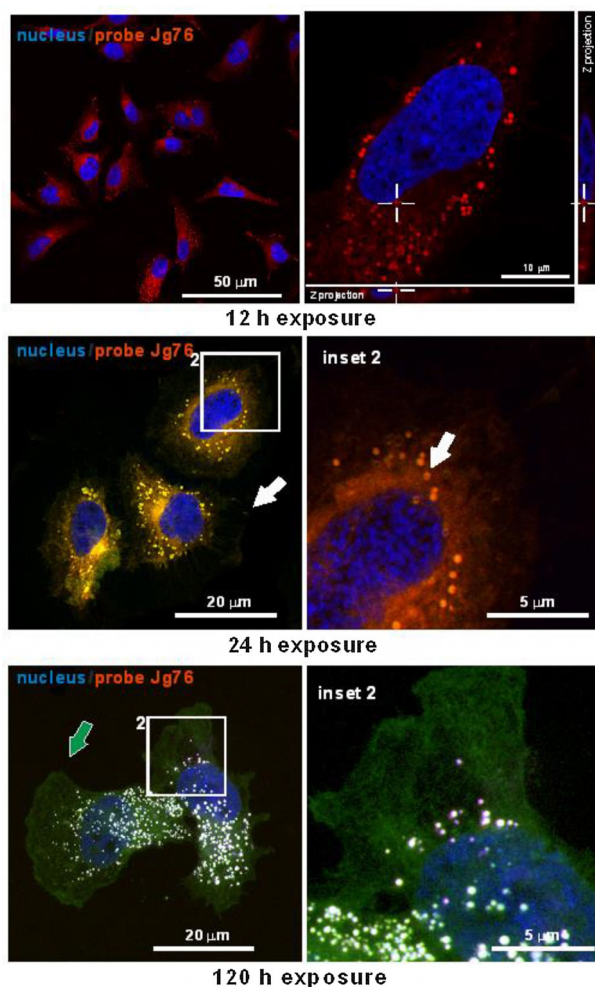


Figure 14. Top) Confocal microscopy projection images of the JG76 probe in HeLa cells 12 h after staining; right) Z-lateral projection images of the locations of the stained structures inside fixed HeLa cells 12 h after staining. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue channel). Middle) Confocal microscopy projection images of the JG76 probe in HeLa cells 24 h after staining obtained by exciting the probe sequentially with $\lambda = 488, 562,$ and 638 nm lasers. Different fluorophore emissions are pseudocolored in their respective wavelengths (green: $500\text{--}550$ nm; red: $570\text{--}620$ nm, purple: $662\text{--}737$ nm). Bottom) Confocal microscopy projection images of the JG76 probe in HeLa cells 120 h after staining.

JG76 probe displayed an endosomal-RER pattern clearly localized within the cytoplasmic and endosomal membranes (arrows) (Figure 14, middle). After 120 h of staining, the JG76 probe was also localized in the cytoplasmic membrane (green arrow) (Figure 14, bottom). HeLa cells did not display detectable signs of toxicity if grown in the presence of the potassium JG76 fluorescent probe for up to 120 h.

Then, HeLa cells, cultured under standard conditions, were incubated with the probe (0.1 mg mL^{-1}) for 2 h. Samples of cells were fixed with 4% paraformaldehyde before images were taken. The nuclei of the fixed cells were stained with Hoechst dye (bisbenzimidazole) before high-resolution confocal microscopy imaging was performed. All confocal cell images were pseudocolored (excitation at $\lambda = 488$ nm and emission in the green/red/near-red region) (Figure 15). Similar to the previ-

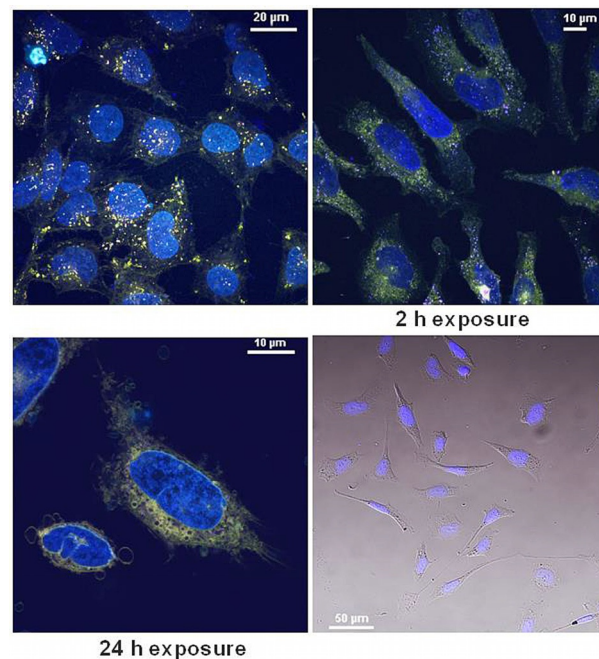


Figure 15. Top left) Confocal microscopy projection images of the JG76 probe in HeLa cells 2 h after staining obtained by exciting the probe sequentially with a $\lambda = 488$ nm laser. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue channel). Top right) Confocal microscopy projection images of the JG76 probe in HeLa cells 2 h after the addition of cereulide to the previous sample. Bottom left) Confocal microscopy projection image of the JG76 probe in HeLa cells 24 h after the addition of cereulide to the first sample showing large dark vacuoles. Bottom right) Fluorescence microscopy image of HeLa cells 12 h after the addition of cereulide, used as a reference. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue channel).

ous experiment, the probe stained intracellular vesicular structures (Figure 15, top left). After exposure to JG76 for 2 h, the cells were exposed to synthetic cereulide (0.2 mg mL^{-1}) for another 2 h (Figure 15, top right). After exposure to JG76 and cereulide for 2 h, the near-red emission of the endosomes was diminished (more pink, less green in pseudocolor), and the staining of the cytoplasmic membrane also diminished. The cytosol appeared to be more stained with the probe. At 24 h after the addition of cereulide to the cells exposed to JG76, the cellular viability decreased significantly and several cells appeared wrinkled and showed membrane blebbing and cytosol vacuolization.

From the images it is clear that the initial fluorescence of JG76, complexed with potassium ions in the potassium-rich structures of the cells, is quenched by cereulide in HeLa cells through potassium-ion-displacement complexation, and this leaves only the residual fluorescence of JG76 in the membranes of the cells as evidence for the action of cereulide. Even more, morphological changes in the HeLa cells, such as the formation of large vacuoles and membrane blebbing, as a result of the action of cereulide with time are easily followed by the residual fluorescence of JG76 on the membranes; this proves the efficiency of the JG76 probe as a cereulide chemical sensor by potassium-ion-complexation displacement. Therefore, the JG76 fluorescent probe can be considered as a useful tool for the visualization of cereulide in live cells and for the lo-

calization of highly polar potassium-rich structures, in comparison to low-polarity membrane structures, from live cells.

3. Conclusions

In conclusion, we developed a fluorogenic procedure that was able to detect cereulide, a toxic metabolite produced by specific strains of *Bacillus cereus*, in rice samples through displacement of potassium cations from a preformed specific complex with a subsequent change in the fluorescence emission. The designed fluorescent probe for potassium cations was suitable for displacement assays with cereulide from organic extracts so that the fluorescence detection of natural cereulide in rice samples was achieved, and this was proven to be a portable and fast method for the in situ detection of cereulide in food extracts. To study the fate of cereulide in live cells, we designed a procedure suitable for live-cell microscopy imaging of HeLa cells by comparing the cellular location of the potassium fluorogenic probe, which stained intracellular vesicular structures that resembled endolysosomes, in the absence and presence of cereulide. We were able to conclude that in the presence of cereulide the fluorescence of the probe was decreased because of complexation of the potassium ions by cereulide.

Experimental Section

Synthesis of JG76

Pd(PPh₃)₄ (10 mg, 5 mol%) was added to a solution of 16-[4-bromo-2-(2-methoxyethoxy)phenyl]-1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecane (JG70; 100 mg, 0.16 mmol) in toluene/*n*BuOH (15 mL/4 mL) under a nitrogen atmosphere in a 100 mL Schlenk flask. Then, a solution of *N*-[1-(1-adamantyl)ethyl]-8-pinacolylboronateperylene-3,4-dicarboxylmonoimide (JG75; 81 mg, 0.16 mmol) in toluene/*n*BuOH/water (5 mL:1.5 mL:0.5 mL) was added, followed by Na₂CO₃ (174 mg, 1.64 mmol), and the mixture was heated under reflux for 24 h. The mixture was then poured into water (100 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL), and worked-up, and then the residue was purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 92:8 v/v) to give *N*-[1-(1-adamantyl)ethyl]-8-[4-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-(2-methoxyethoxy)phenyl]perylene-3,4-dicarboxylmonoimide (JG76; 58 mg, 40%) as a purple solid. M.p. 135–136 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.53 (m, 2H, C_{Ar}H), 8.49–8.33 (m, 3H, C_{Ar}H), 8.02 (m, 1H, C_{Ar}H), 7.59–7.54 (m, 2H, C_{Ar}H), 7.25–6.91 (m, 4H, C_{Ar}H), 5.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH), 4.23 (m, 2H, CH₂), 3.80–3.54 (m, 24H, 12CH₂), 3.66–3.40 (s, 5H, CH₂ + CH₃), 1.98 (m, 3H, 3CH), 1.85–1.81 (m, 3H, 1.5CH₂), 1.73–1.62 ppm (m, 12H, 4.5CH₂ + CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.7 (C=O), 165.7 (C_{Ar}), 165.0 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 132.6–123.2 (C_{Ar} + CH_{Ar}), 121.9 (C_{Ar}), 121.0 (C_{Ar}), 120.1 (C_{Ar}H), 116.5 (C_{Ar}), 72.1–67.0 (CH₂), 59.3–58.2 (CH + CH₃), 40.5 (CH), 38.9 (CH₂), 38.2 (C_q), 37.2 (CH), 34.2 (CH), 32.1–29.5 ppm (CH + CH₃). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2955, 2924, 2848, 1738 (C=O), 1692 (C=O), 1685 (C=O), 1651, 1590, 1571, 1506, 1457, 1384, 1354, 1248, 1122 cm⁻¹. HRMS (MALDI): *m/z*: calcd for C₅₅H₆₃N₂O₉: 895.4528 [*M*+H]⁺; found: 895.4535.

Synthesis of Triazacryptand-perylenemonoimide JG103

Pd(PPh₃)₃ (5.6 mg, 5 mol%) was added to a solution of bromotriazacryptand JG101 (59 mg, 0.097 mmol) dissolved in toluene/*n*BuOH

(10 mL:3.3 mL) under a nitrogen atmosphere in a 100 mL Schlenk flask. Then, boronic ester JG75 (82 mg, 0.10 mmol) dissolved in toluene/*n*BuOH (3.5 mL:1 mL) was added dropwise. Then, Na₂CO₃ (102.2 mg, 0.97 mmol) dissolved in water (3 mL) was added, and the mixture was stirred under reflux for 24 h. The mixture was poured into water (30 mL), and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). After workup, the solid residue was purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 50:4) from which the triazacryptand-perylenemonoimide JG103 (48 mg, 42%) was obtained as a purple solid. M.p. 193–195 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.53 (m, 2H, C_{Ar}H), 8.49–8.33 (m, 3H, C_{Ar}H), 8.02 (m, 1H, C_{Ar}H), 7.59–7.54 (m, 2H, C_{Ar}H), 7.25–6.91 (m, 4H, C_{Ar}H), 5.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH), 4.23–3.50 (m, 39H, 18CH₂ + CH₃), 2.26–2.20 (m, 6H, 2CH₃), 1.98 (m, 3H, 3CH), 1.85–1.81 (m, 2H, CH₂), 1.73–1.62 ppm (m, 13H, 6CH₂ + CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165.8 (C_{Ar}), 165.1 (C_{Ar}), 153.2 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 132.9, 132.3, 132.2, 130.0, 129.6, 128.9, 128.5, 128.2, 127.0, 126.8, 126.7, 123.5, 122.3, 121.3, 120.4, 120.1, 114.8, 114.4, 114.2, and 110.0 (C_{Ar} + CH_{Ar}), 71.4, 71.0, 70.8, 70.5, 69.6, 68.2, and 67.3 (CH₂), 59.2 (CH₃), 58.2 (CH), 53.6–52.5 (CH₂), 40.4 (CH), 38.2 (C_q), 37.1 (CH), 31.7, 31.1, 29.2, and 29.0 (CH + CH₂), 21.3 (CH₂), 14.3 and 13.3 ppm (CH₃). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2955, 2922, 2856, 1736 (C=O), 1696 and 1682 (C=O), 1651, 1592, 1557, 1509, 1456, 1351, 1250, 1170, 1119, 1106, 1049, 959, 812, 750, 721, 697, 667 cm⁻¹. HRMS (ESI): *m/z*: calcd for C₇₃H₈₂N₄NaO₁₀: 1197.5923 [*M*+Na]⁺; found: 1197.6001.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (Projects CTQ2015-71353-R and AES-PI16/000496), Junta de Castilla y León, Consejería de Educación y Cultura y Fondo Social Europeo (Project BU232U13), and the European Commission, Seventh Framework Programme (Project SNIFFER FP7-SEC-2012–312411). J. G.-C. thanks Ministerio de Economía y Competitividad for his predoctoral FPU fellowship.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: cereulide • fluorescent probes • potassium • sensors • valinomycin

- [1] a) L. P. Stenfors Arnesen, A. Fagerlund, P. E. Granum, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 579–606; b) E. Granum, T. Lund, *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *157*, 223–228.
- [2] G. Lücking, M. K. Dommel, S. Scherer, A. Fouet, M. Ehling-Schulz, *Microbiology* **2009**, *155*, 922–931.
- [3] S. Ceuppens, N. Boon, M. Uyttendaele, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2013**, *84*, 433–450.
- [4] M. Kranzler, K. Stollewerk, K. Rouzeau-Szynalski, L. Blayo, M. Sulyok, M. Ehling-Schulz, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1640, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01640>.
- [5] Y. Cui, Y. Liu, X. Liu, X. Xia, S. Ding, K. Zhu, *Toxins* **2016**, *8*, 156, <https://doi.org/10.3390/toxins8060156>.
- [6] N. A. Logan, *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *112*, 417–429.
- [7] a) N. A. Magarvey, M. Ehling-Schulz, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10698–10699; b) M. Ehling-Schulz, E. Frenzel, M. Gohar, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 704, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>; c) G. Lücking, E. Frenzel, A. Rüttschle, S. Marxen, T. D. Stark, T. Hofmann, S.

- Scherer, M. Ehling-Schulz, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1101, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01101>.
- [8] Cereulide: a) A. Makarasin, K. Yoza, M. Isobe, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 688–698; b) A. Makarasin, T. Nishikawa, M. Isobe, *Synthesis* **2009**, 2184–2204; valinomycin: c) C. Annese, D. I. Abbrescia, L. Catucci, L. D'Accolti, N. Denora, I. Fanizza, C. Fusco, G. La Piana, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 751–757; d) R. M. Iacobazzi, C. Annese, A. Azzariti, L. D'Accolti, M. Franco, C. Fusco, G. La Piana, V. Laquintana, N. Denora, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1189–1192.
- [9] a) M. M. Häggblom, C. Apetroaie, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2479–2483; b) T. Bauer, T. Stark, T. Hofmann, M. Ehling-Schulz, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1420–1428; c) V. Fricker, U. Messelhaüßer, U. Busch, S. Scherer, M. Ehling-Schulz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1892–1898; d) H. T. Rønning, T. N. Asp, P. E. Granum, *Food Addit. Contam.* **2015**, *32*, 911–921; e) L. Delbrassinne, M. Andjelkovic, A. Rajkovic, P. Dubois, E. Ngnessan, J. Mahillon, J. Van Loc, *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 969–979.
- [10] a) M. A. Andersson, P. Hakulinen, U. Honkalampi-Hamalainen, D. Hoornstra, J.-C. Lhuguenot, J. Maki-Paakkanen, M. Savolainen, I. Severin, A.-L. Stammati, L. Turco, A. Weber, A. von Wright, F. Zucco, M. Salkinoja-Salonen, *Toxicol.* **2007**, *49*, 351–367; b) E. L. Jääskeläinen, V. Teplova, M. A. Andersson, L. C. Andersson, P. Tammela, M. C. Andersson, T. I. Pirhonen, N.-E. L. Saris, P. Vuorela, M. S. Salkinoja-Salonen, *Toxicol. in Vitro* **2003**, *17*, 737–744.
- [11] a) J. García-Calvo, S. Vallejos, F. C. García, J. Rojo, J. M. García, T. Torroba, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11915–11918; b) J. García-Calvo, P. Calvo-Gredilla, M. Ibañez-Llorente, T. Rodríguez, T. Torroba, *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 810–824; c) B. Díaz de Greñu, J. García-Calvo, J. Cuevas, G. García-Herbosa, B. García, N. Busto, S. Ibeas, T. Torroba, B. Torroba, A. Herrera, S. Pons, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3757–3764; d) B. Díaz de Greñu, D. Moreno, T. Torroba, A. Berg, J. Gunnars, T. Nilsson, R. Nyman, M. Persson, J. Pettersson, I. Eklind, P. Wästerby, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4125–4128.
- [12] a) S. Kaloyanova, Y. Zagranyski, S. Ritz, M. Hanulová, K. Koynov, A. Vonderheit, K. Müllen, K. Peneva, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2881–2884; b) U. Lewandowska, W. Zajackowski, L. Chen, F. Bouillière, D. Wang, K. Koynov, W. Pisula, K. Müllen, H. Wennemers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12537–12541; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12745–12749; c) A. Bolag, N. Sakai, S. Matile, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 9006–9014; d) J. A. Hutchison, H. Uji-i, A. Deres, T. Vösch, S. Rocha, S. Müller, A. A. Bastian, J. Enderlein, H. Nourouzi, C. Li, A. Herrmann, K. Müllen, F. De Schryver, J. Hofkens, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 131–136; e) U. Lewandowska, W. Zajackowski, W. Pisula, Y. Ma, C. Li, K. Müllen, H. Wennemers, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3804–3809.
- [13] a) T. Schwarze, R. Schneider, J. Riemer, H.-J. Holdt, *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 241–247; b) T. Schwarze, J. Riemer, S. Eidner, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11306–11310; c) S. Ast, T. Schwarze, H. Müller, A. Sukhanov, S. Michaelis, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, T. Körzdörfer, A. Dürkop, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14911–14917.
- [14] a) B. Sui, X. Yue, M. G. Tichy, T. Liu, K. D. Belfield, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 1189–1192; b) H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1468–1469; see also: c) X. Zhou, F. Su, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18530–18533; d) W. Namkung, P. Padmawar, A. D. Mills, A. S. Verkman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7794–7795; e) X. Zhou, F. Su, W. Gao, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, *Biomaterials* **2011**, *32*, 8574–8583; f) R. D. Carpenter, A. S. Verkman, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1160–1163; g) X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590–659; h) T. Hirata, T. Terai, H. Yamamura, M. Shimonishi, T. Komatsu, K. Hanaoka, T. Ueno, Y. Imaizumi, T. Nagano, Y. Urano, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 2693–2700.
- [15] E. G. Biesta-Peters, M. W. Reij, R. H. Blaauw, P. H. in't Veld, A. Rajkovic, M. Ehling-Schulz, T. Abee, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7466–7472.
- [16] M. C. Rose, R. W. Henkens, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1974**, *372*, 426–435.
- [17] a) A. Zuberovic Muratovic, R. Tröger, K. Granelli, K.-E. Hellenäs, *Toxins* **2014**, *6*, 3326–3335; b) M. Yamaguchi, T. Kawai, M. Kitagawa, Y. Kumeda, *Food Microbiol.* **2013**, *34*, 29–37; c) M. Decler, A. Rajkovic, B. Sas, A. Madder, S. De Saeger, *J. Chromatogr. A* **2016**, *1472*, 35–43.
- [18] a) S. Marxen, T. D. Stark, E. Frenzel, A. Rüttschle, G. Lücking, G. Pürstinger, E. E. Pohl, S. Scherer, M. Ehling-Schulz, T. Hofmann, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2439–2453; b) S. Marxen, T. D. Stark, A. Rüttschle, G. Lücking, E. Frenzel, S. Scherer, M. Ehling-Schulz, T. Hofmann, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10637, <https://doi.org/10.1038/srep10637>; c) S. Marxen, T. D. Stark, A. Rüttschle, G. Lücking, E. Frenzel, S. Scherer, M. Ehling-Schulz, T. Hofmann, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8307–8313.
- [19] a) L. Rodríguez-Fernández, R. Valiente, J. Gonzalez, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6614–6625; b) L. García-Hevia, R. Valiente, R. Martín-Rodríguez, C. Renero-Lecuna, J. González, L. Rodríguez-Fernández, F. Aguado, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *Nanoscale* **2016**, *8*, 10963–10973; c) B. Sanz, M. P. Calatayud, T. E. Torres, M. L. Fanarraga, M. R. Ibarra, G. F. Goya, *Biomaterials* **2017**, *114*, 62–70.

Received: March 21, 2017

Version of record online June 12, 2017

Journal of Nanomaterials

Effect of size, shape and composition on the interaction of different nanomaterials with HeLa cells.

Carlos Renero-Lecuna,¹ Nerea Iturrioz-Rodríguez,¹ Eloisa González-Lavado,¹ Esperanza Padín-González,¹ Elena Navarro-Palomares,¹ Lourdes Valdivia-Fernández,¹ Lorena García-Hevia,² Mónica L Fanarraga¹, Lorena González-Legarreta,^{*1}

¹ Grupo de Nanomedicina, Universidad de Cantabria-IDIVAL, 39011, Santander, Spain.

² Amthena Lab, International Iberian Nanotechnology Laboratory, 4715-330, Braga, Portugal.

*Correspondence should be addressed to Lorena González-Legarreta; lgonzalez@idival.org

Abstract

The application of nanomaterials in the fields of medicine and biotechnology is of enormous interest, particularly in the areas where traditional solutions have failed. Unfortunately, there is very little information on how to optimize the preparation of nanomaterials for their use in cell culture and on the effects that these can trigger on standard cellular systems. These data are pivotal in nanobiotechnology for the development of different applications and to evaluate/compare the cytotoxicity among the different nanomaterials or studies.

The lack of information drives many laboratories to waste resources performing redundant comparative tests that often lead to partial answers due to differences in (i) the nature of the start-up material, (ii) the preparation, (iii) functionalization or (iv) resuspension, (v) the stability/dose of the nanomaterial, etc. These variations in addition to the different analytical systems contribute to the artefactual interpretation of the effects of nanomaterials and to inconsistent conclusions between different laboratories.

Here we investigate the biosynthetic interaction between a wide range of nanomaterials (nanotubes, various nanoparticles, graphene oxide, liposomes) with HeLa cells as a reference cellular system. These human cells, widely used as cellular models for many studies, represent a reference system for comparative studies between different nanomaterials or conditions and, in last term, between different laboratories.

Introduction

Nanomaterials offer revolutionary solutions to traditional problems and thus, they have been incorporated into many different consumer goods including many for human consumption such as cosmetics, biotechnological and pharmacological products, medicines or food additives. Unfortunately, major developments are never exempt of associated problems. Nanomaterials have been connected with all types of toxicological, cumulative or environmental problems [1–6]. However, the reality is that during evolution, vegetable and animal species have been exposed to environmentally generated nanomaterials and this has resulted in the appearance of natural resistances. The issue to be faced now is to understand and control the effect of the many different anthropogenic nanomaterials currently in use.

Society needs to know the implications of the use of the different nanomaterials in everyday products. But to find out the possible side effects of the exposure for each nanomaterial it is necessary to establish a series of *in vitro* and *in vivo* objective tests.

Cellular models are very convenient because they do not require complex laboratory facilities and can provide pivotal information on the toxicological effects of nanomaterials, furthermore, nowadays there are many cellular models to investigate these interactions with nanomaterials. In fact, many studies have been carried out using cells of different origins and diverse natures. However, this poorly protocolised research has resulted in the production of confusing and incoherent data that result in chaos when it comes to understand and to compare the effect of a particular nanomaterial at the same dose in a unique cellular system.

In our laboratories, we have been studying the *in vitro* effects of several types of nanomaterials for almost a decade. This has offered us a broad critical view on the effects produced by many of these compounds in different cellular systems. We now know that the same nanomaterial can produce different cytotoxic effects in different cells, depending on the nature and origin of the cell [7]. For example, macrophages generally suffer more cumulative or degradative effects - i.e. reactive oxygen species (ROS) accumulation-, than other cells for the same material at the same dose due to their high avidity for capturing nanomaterials [8–13]. On the contrary, malignant melanoma or glioblastoma multiforme cells have great resistance to cytotoxicity for most nanomaterials [7,14, 15]. Also, some cells have a special idiosyncrasy that makes them tolerant to certain types of nanomaterials, such as neurons. These cells can survive to multi-walled carbon nanotubes exposure better than macrophages, but are much more sensitive to any other nanomaterials [8,16–18].

There are many examples in the literature where cells exposed to the same nanomaterial respond differently. This is the case of carbon nanotubes where the reported effects range from innocuity to very acute toxicological or long term accumulative effects [19–24]. Moreover, in the case of carbon nanotubes, there are different cellular phenotypes, after exposure, depending on the type of the used nanotubes. For example, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) seem to interact more with DNA [18,25,26] than multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) that display biomimetic properties with the cytoskeleton [9,15,19,27]. This fact reveals the unique features of each nanomaterial, for example in this case, carbon nanotubes, the importance of the diameter of the tube in the interaction with different biological filaments such as DNA (2 nm), intermediate filaments (10-15 nm), microtubules (25 nm) or actin (4-8 nm).

For all these reasons, it seems necessary to carry out standard tests where a single cell type is exposed to the same concentration of different nanomaterials, functionalised and processed identically, following the same protocol. This test allows the direct comparison of the effect of the different nanomaterials on a unique system *in vitro*. For this study we have chosen HeLa cells as a reference cellular system. This is a human epithelial cell line originally obtained from a cervical carcinoma that is universally employed as a reference cellular model to test numerous toxic products, among them, nanomaterials. One of the great advantages of using this cell line is that its genome and proteome is known in great detail [28–30] and there are numerous studies performed in many laboratories that provide extraordinary experimental support for these analyses.

On the other hand, this cell line has been used in many laboratories on the assumption that comprise putatively homogeneous clonal cell population. However, recent studies

demonstrate that HeLa cells are heterogeneous [31]. This fact means that the results between different laboratories are not always directly comparable or reproducible, reinforcing the idea that a standard protocol must be carried out in the same cell line -from the same laboratory- to test different nanomaterials processed in identical conditions. In this study we investigate the effect of identically prepared (functionalization/dose) nanomaterials. These were incubated for equal periods of time and were analysed following the same protocol for direct comparison of their effect on these cells, thus to establish a comparison of their exposure phenotypes on this unique cell model.

Materials and Methods

1. Nanomaterials

Different nanomaterials were used in this work. High-purity MWCNTs were obtained from Nanocyl NC3100™. These nanotubes have been fully characterised in previous publications [15]. Monodisperse silica spheres (500 nm) were prepared using the Stöber method as described in our previous work [32]. These silica particles were coated with carbon nanotubes as detailed elsewhere [33]. Cationic liposomes (CLPs) were commercially obtained from Nanovex biotechnologies S.L. and prepared from basic components by a hydration process. All liposomes showed a narrow size distribution with mean particle sizes of 150-200 nm and polydispersity indexes of less than 0.4. TiO₂ and ZnO nanoparticles (Z-COTE®) were commercial (BASF Chemical Company). ZnO:Co²⁺ nanowires were synthesised in-house [34–36]. Chemically exfoliated Graphene Oxide (GO) was purchased commercially (Graphenea, Spain). Morphological characterization of the nanomaterials was performed using a JEOL JEM 1011 transmission electron microscope (TEM) operating at 100 kV. Nanomaterials were suspended in ethanol and adsorbed onto 400 mesh carbon-coated copper grids.

2. Functionalization of nanomaterials

Nanomaterials were resuspended and functionalised in a saline solution containing 30% fetal bovine serum (FBS, Gibco) by mild probe sonication (3-5 cycles, 2-5'' at a frequency of 20 kHz) in a SONICS Vibracell VCX130 Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc), before resuspension in cell culture medium and addition to the cell cultures.

3. Cell culture, cycle and viability tests, staining, immunofluorescence and imaging

HeLa cells (from the European Molecular Biology Laboratory Cell Bank, passage 10) were cultured under standard conditions in Minimum Essential Medium (MEM) containing 10% FBS and antibiotics (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Phase contrast micrographs were taken at different time points using a Progress CT5 (Jenoptik) digital camera coupled to a Nikon Eclipse TS100-F. Cell viability assessments were performed using a standard trypan blue assay. The cell cycle distribution was analysed by flow cytometry using a Muse® Cell Analyzer (Merck KGaA) following the manufacturer's instructions. Immunostaining was performed on cells fixed in 4% paraformaldehyde. Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate, Hoechst dye (Bisbenzimidazole) and Acridine Orange hemi (zinc chloride) salt (all from Sigma-Aldrich) were used to stain actin, DNA and cytoplasm, respectively. Microtubules were immunostained with B512 anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) and a secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular probes, Invitrogen). Confocal microscopy images were performed with a Nikon A1R

confocal microscope and were processed with the NIS-Elements Advanced Research software. All confocal cell images are pseudocoloured.

Results and Discussion

Carbon nanotubes

Carbon nanotubes (CNTs) represent a class of highly versatile materials that display very interesting mechanical, thermal, electronic, and biological properties [37]. These nanomaterials have been broadly used in numerous *in vitro* and *in vivo* toxicity studies and there is a lot of documentation regarding their effects. However, there is some confusion in the literature that we think could be due to the purity, the surface treatment, or the morphological properties of the nanotubes, among others. Here we investigate the effect of MWCNTs on HeLa cells incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$. Figure 1(b) shows the characterization of these nanomaterials by TEM and the different steps of the internalization in these cells. For their use, MWCNTs are functionalised with serum proteins to trigger receptor mediated endocytosis (Figure 1(a)) [38–40]. Figure 1(c) (right) shows HeLa cells incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of MWCNTs for 72 h. Previous studies report how MWCNTs have a high affinity for the cellular cytoskeleton [9,21,41], causing detectable morphological changes and alterations in the biomechanics of HeLa cells which results in slower migration rates [15,19], proliferative blockage and, depending on the dose/exposure time, genomic instability and cytotoxic effects (Figure 1(d)) [7,42–44]. In this study, HeLa cells exposed to nanotubes display an elongated morphology (Figure 1(c)), abnormal mitotic figures (Figure 1(d)) and aberrant cell cycles (Figure 1(e)) where we can see an increased S and/or G2 phases, depending on the incubation dose/times. Confocal microscopy examination of MWCNTs-treated cell cultures confirmed indicative signs of the biomechanical and disruptive effects of these nanotubes on HeLa cells, including: i) cell retraction, ii) membrane blebbing, iii) nuclear DNA compaction, iv) presence of micronuclei, as well as other previously described cytoskeletal changes including disorganized microtubular patterns or a reactive cortical actin [14]. These morphological changes and cytotoxic effects were corroborated by flow cytometry (Figure 1(e)), showing a patent blockage in the S phase of the cell cycle, suggesting MWCNTs interference with DNA replication.

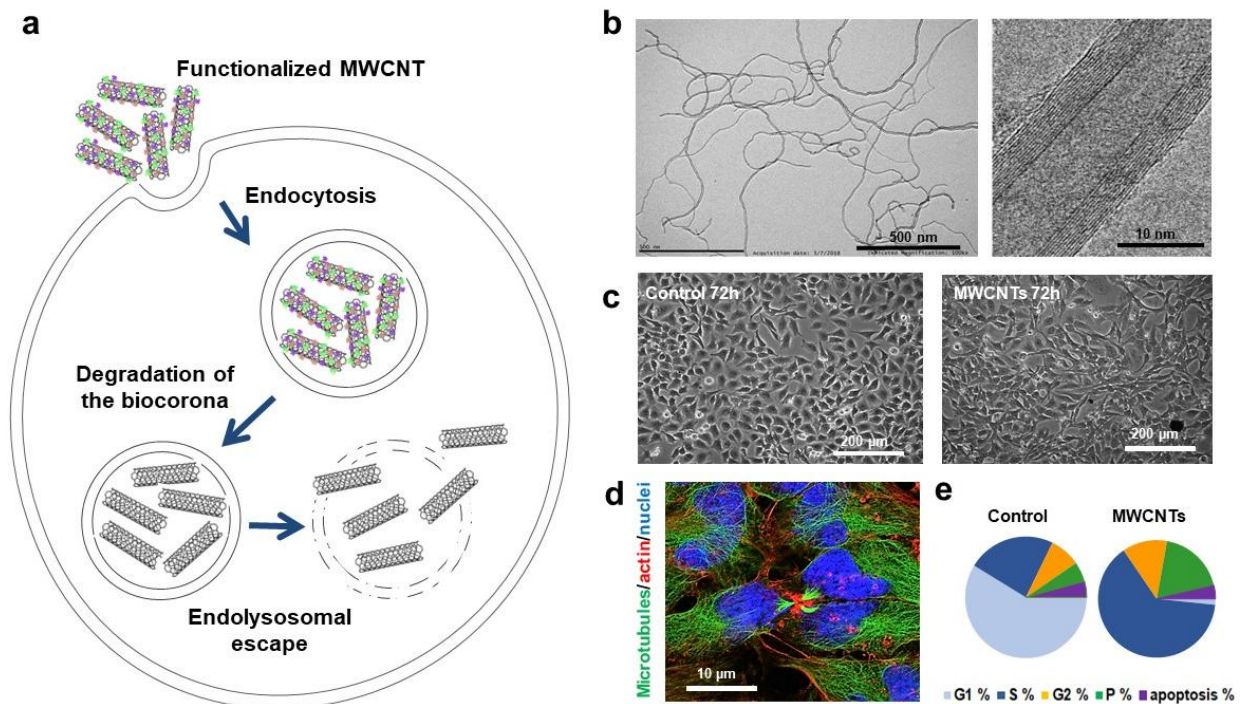


Figure 1: Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) interaction with HeLa cells. (a) Diagram of their internalization and endo-lysosomal escape. (b) Low and high-resolution TEM images of MWCNTs. (c) Phase contrast images of control and 72 h MWCNTs-exposed HeLa cells. (d) Asymmetric triple mitosis representative of the biomechanical defects triggered by MWCNTs in the microtubule cytoskeletal machinery. (e) MWCNTs-treatment resulted in a drop in the number of cells at the G1 stage (non-dividing cells, represented in light blue), and a rise of cells at S (DNA synthesis), G2 stage (mitotic), polyploidy (P, aberrant genomic load) and apoptosis. Changes in the cell cycle after 72 h incubation with MWCNTs are indicative of cell cycle blockage.

Silica particles

Silica particles are traditionally considered to be quite biocompatible and have been used as a therapy delivery system due to their interesting physico-chemical properties [45]. Figure 2 compiles the characteristics of these particles and several aspects of their relationship with the HeLa cells used in this study. These particles of ca. 500 nm diameter size, when functionalised with serum proteins are receptor-mediated endocytosed. Figure 2((b), right) shows the trajectory of these particles inside HeLa cells: particles are rapidly internalised by HeLa cells after overnight exposure. In the endo-lysosomal route, the silica particle biocorona proteins are degraded by the local lysosomal proteases. Protein-stripped silica particles are exocytosed from these cells a few hours after engulfment (see Figure 2(c)) [33]. These exocytosed silica particles can be re-endocytosed after adsorbing other proteins from the surrounding culture medium on their surfaces as part of the biocorona. Previous studies demonstrate a constant concentration of approximately 30% of the total particles in the culture outside the cells [32]. As shown in Figure 2(d), silica particles are highly biocompatible at 50 $\mu\text{g/mL}$, and no significant changes in the morphology of the cells after 72 h of exposure were appreciated.

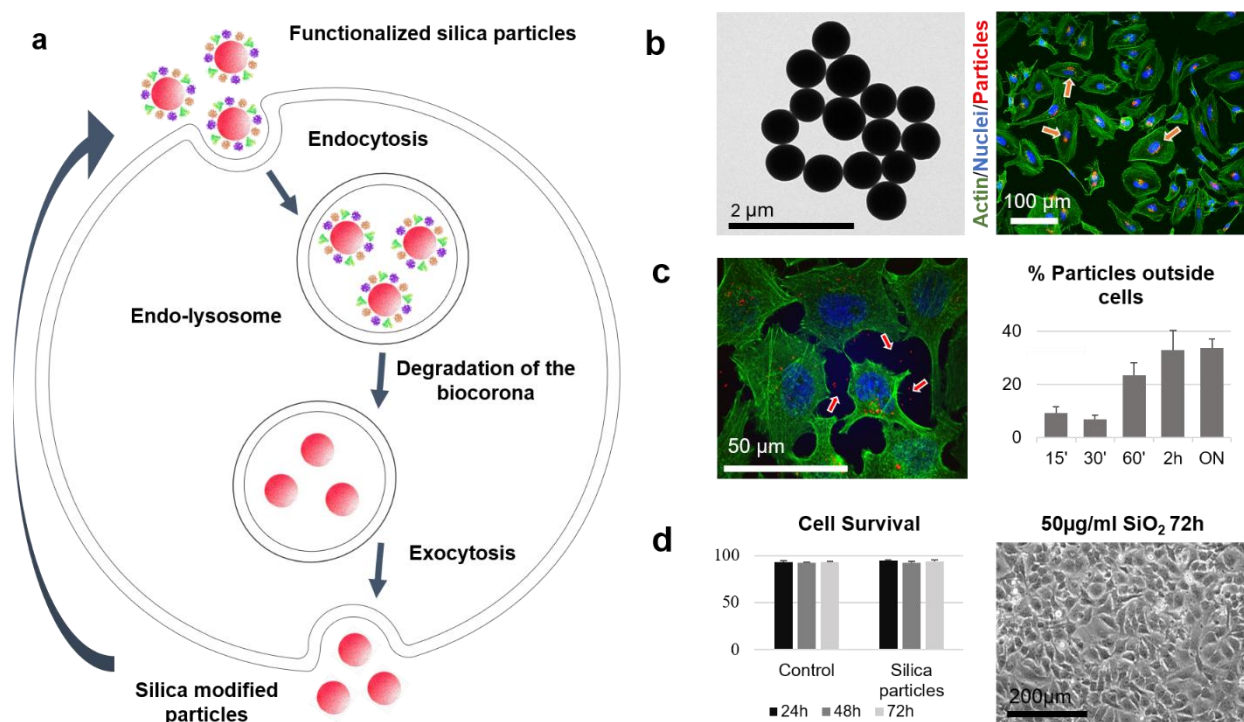


Figure 2: Silica particles interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of silica particles processing in HeLa cells. Particles are internalized in cells via endocytosis. In endo-lysosomes, their biocorona is degraded and stripped particles are finally exocytosed. ((b), left) TEM characterization of the as-prepared silica particles. ((b), right) Confocal image demonstrating silica particles inside HeLa cells. (c) Confocal image where the exocytosed silica particles are detected (red arrows). The accompanying histogram shows the percentage of extracellular particles after 15', 30', 1 h, 2 h and overnight. ((d), left) Percentage of live cells at different exposure times. ((d), right) Phase contrast image of HeLa cells presenting no detectable cytotoxicity.

CNT-coated silica particles

Carbon nanotubes can be used to coat silica particles to trigger lysosomal exit imitating viral escape mechanisms [33,46]. Figure 3 shows a summary of the results obtained after the exposure of HeLa cells to silica particles coated with MWCNTs. Since the carbon nanotubes of the coating are functionalised with serum proteins, nanotube-coated silica particles also enter cells via endocytosis (Figure 3(c), left). Once inside the endo-lysosome, the local proteases degrade the coating proteins, stripping the carbon nanotubes that then interact with the lysosomal membrane (Figure 3(c), right), tearing the vesicle apart and escaping into the cytosol [33]. These CNT-coated silica particles do not trigger detectable cytotoxicity either (Figure 3(d)) at a final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ [33,46].

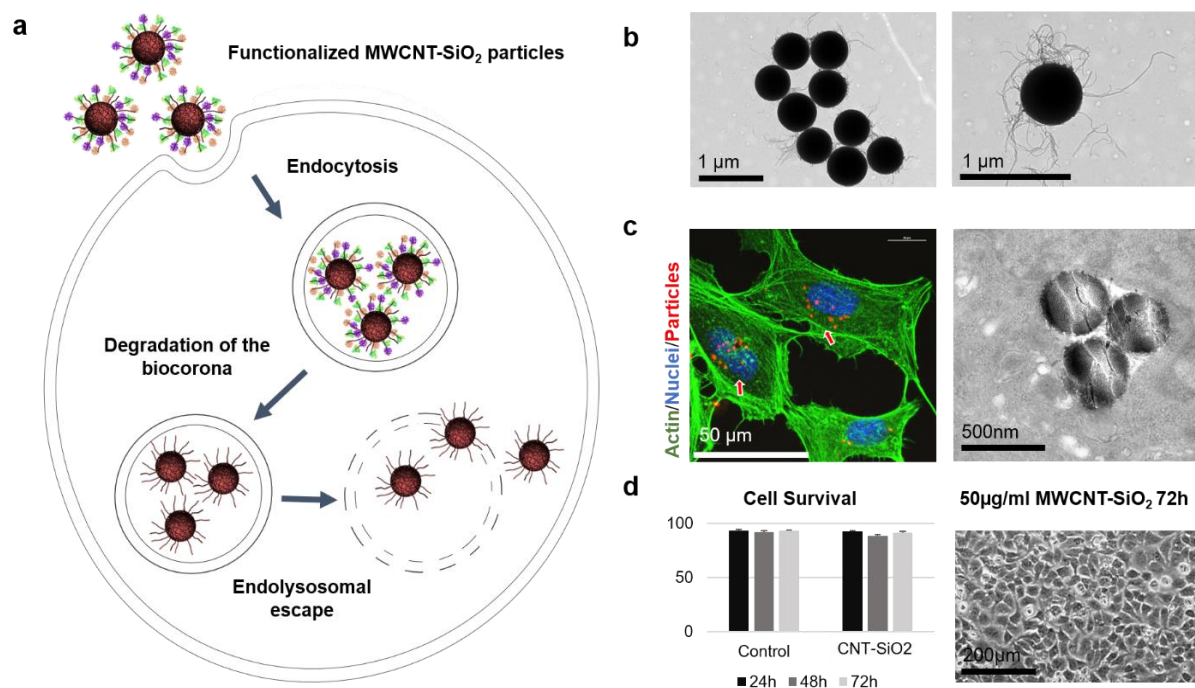


Figure 3: CNT-silica particles interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of CNT-silica particles trajectory in HeLa cells. Once these particles are internalized via endocytosis, the CNTs biocorona is degraded. Stripped nanotubes interact with the lysosomal membrane and escape the endo-lysosomal compartment. (b) TEM images of some representative CNT-silica particles. ((c), left) Confocal microscopy images demonstrating internalised particles in HeLa cells (red arrows). ((c), right) TEM micrograph of a section of a HeLa cell cytoplasm where the CNTs of the coating are observed piercing the endo-lysosomal membrane. ((d), left) Percentage of live cells after 24 h, 48 h and 72 h of exposure to 50 $\mu\text{g/mL}$ of the CNT-coated particles. ((d), right) Phase contrast image of HeLa cells displaying no detectable cytotoxic changes.

Graphene Oxide (GO) flakes

Graphene oxide is a nanomaterial that, up to date, has been reported to be quite biocompatible in different systems *in vitro* and *in vivo*. The GO composition, the flat morphology as well as the oxidation of the structure result in a very biocompatible element. Oxidised graphene allotropes have been shown to be degradable by lysosomal enzymes, being much more biocompatible than the non-oxidised counterpart nanostructures [47–50]. Oxidation produces small enzymatic attack points on the graphene layers that favour degradation by the lysosomal enzymes. Figure 4 shows a summary of the intracellular entry and trajectory of GO in HeLa cells. GO produces little detectable morphological or biomechanical changes at the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. Figure 4(b) shows a TEM micrograph of one of the GO sheets used in this study. As with carbon nanotubes, GO is functionalised by serum proteins absorbed on the surface. This protein corona triggers receptor-mediated cellular entry. Unlike for carbon nanotubes, no interaction phenomena of GO with intracellular filaments such as DNA, microtubules or actin are observed or reported so far (Figure (c)).

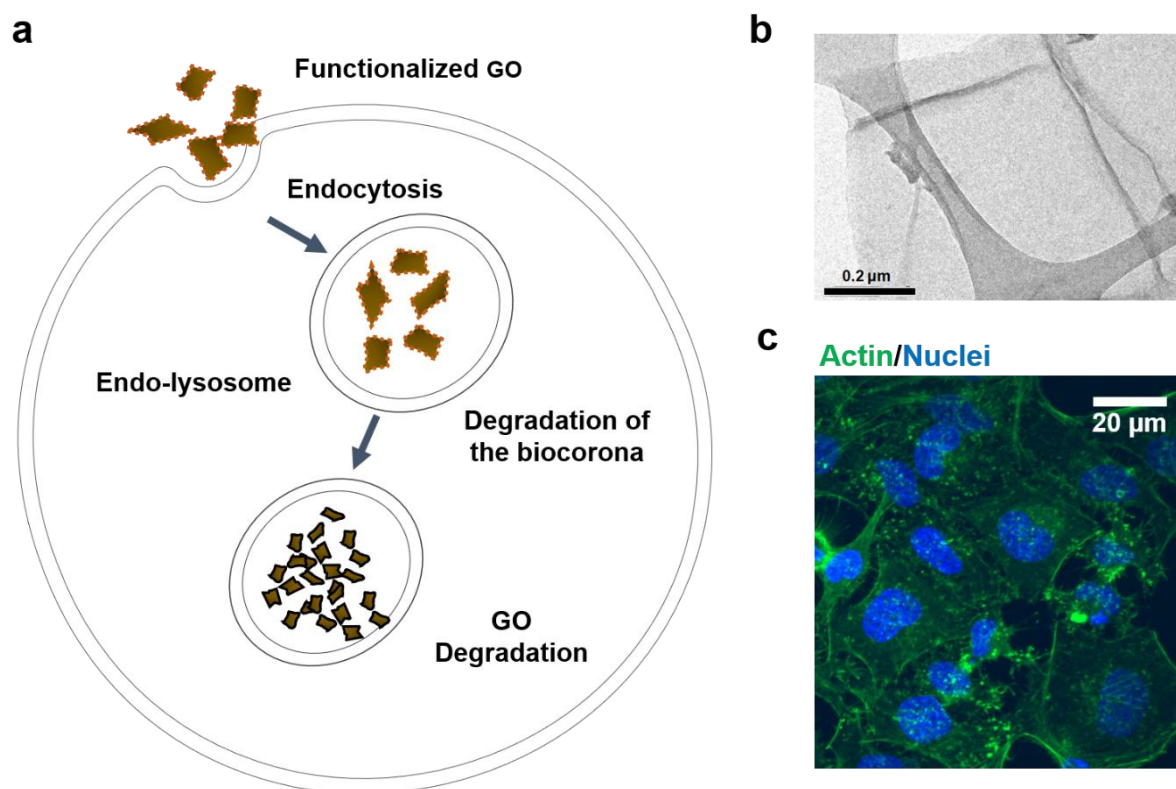


Figure 4: GO interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of functionalised GO contacting with cellular surface receptors, and invading the cell via endocytosis. Internalized GO flakes are progressively degraded in lysosomes. (b) TEM characterization of GO flakes. (c) Confocal microscopy images of HeLa cells exposed to 50 $\mu\text{g/mL}$ functionalized GO flakes displaying a normal morphology after 72 h exposure.

Liposomes

Liposomes are widely used as delivery systems to transfer drugs, proteins or nucleic acids into target cells. These nanovesicles made up of a lipid bilayer can encapsulate different types of therapies into an inner aqueous phase or lipid bilayer and are considered, in general, very biocompatible nanostructures [51–53]. To improve the carrier efficiency, it is necessary to understand the mechanism of uptake into cells and the release of the therapy in the cytoplasm of the target cell, and both depend on the composition of the lipocarrier. In our study, liposomes are functionalised in 30% serum, just like the other nanomaterials. These particular types of commercial cationic liposomes (see Materials) are captured by endocytosis, after interacting with the cell surface receptors (Figure 5(a)). As a general rule, this process is strongly influenced by the nature and density of the charge of the liposomes. Figure 5 depicts some characteristic data of these liposomes and their interaction with HeLa cells. Cultures were incubated with the liposomes resuspended in MEM medium for 72 h at 37°C. Figure 5(b, boxes) show a few DiI-labelled cationic liposomes inside HeLa cells. This particular type of liposomes did not trigger any observable morphological changes in HeLa cells. Neither changes were observed in the cell cycle or viability of HeLa cells after 72 h incubation with these nanomaterials (Figure 5(d) and (f)).

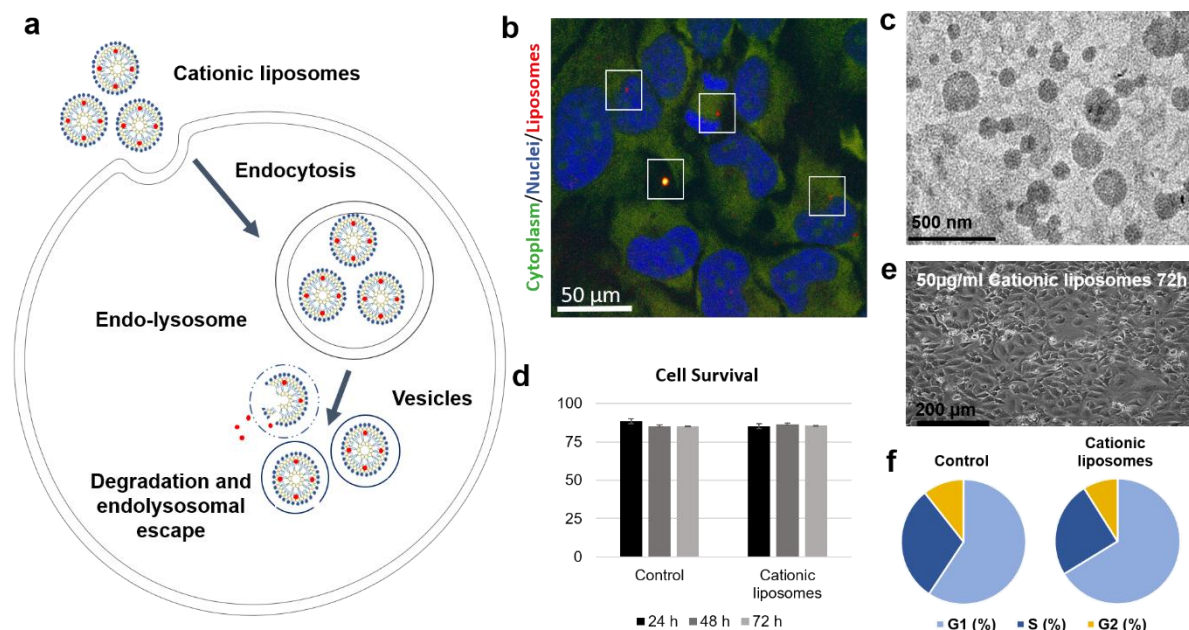


Figure 5: Cationic liposomes interaction with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular cycle of cationic liposomes in HeLa cells. (b) Confocal microscopy image of HeLa cells exposed to DiI-labelled cationic liposomes (red channel, in boxes). (c) TEM images of the as-prepared cationic liposomes. (d) HeLa cells viability after cationic liposomes exposure. (e) Phase-contrast images of HeLa cells exposed to the cationic liposomes for 72 h. (f) Comparative study of the cell cycle between HeLa cells with CLP by flow cytometry.

TiO₂ nanoparticles

Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles are some of the most commonly manufactured nanomaterials that are extensively used as components of paints, cosmetics, food and many other consumer products [1,54]. Due to their physical and chemical properties, traditionally, TiO₂ nanoparticles have been considered as a low-toxicity particles, in fact they are often used as a negative controls in several studies [55]. However, there is increasing evidences *in vitro* studies suggesting that they can induce oxidative stress and genotoxicity upon UVA exposure [56]. In our standard assay, HeLa cells exposed to high doses (50 µg/mL) of TiO₂ nanoparticles displaying no observable effects [57]. Figure 6 shows a summary of the findings in Hella cells exposed to serum-functionalised TiO₂. Confocal microscopy images of HeLa cells show a normal distribution of microtubules without any evidence of alteration in cell morphology (Figure 6(b)). Neither were detected abnormalities in the cell cycle nor increased cell death after exposure to these particles, visible in vesicles in the cellular cytoplasm 72 h after exposure [57-60]. Furthermore, some TiO₂ nanoparticle aggregates were observed in the centrosomal region of the cells, as previously reported [61]. Interestingly, these nanoparticles can remain encapsulated in membranes for long periods of time (24-48 h) without any evidence of their exocytosis [60]. In general, most studies carried out in HeLa support the hypothesis that TiO₂ nanoparticles are highly biocompatible under standard culture conditions.

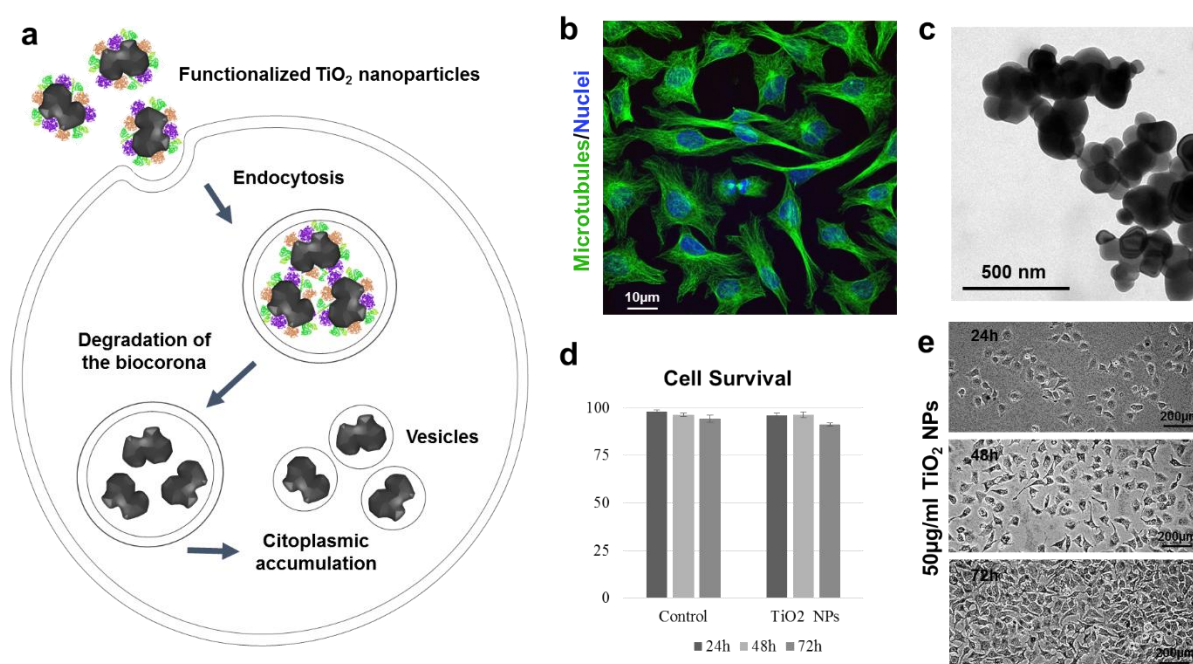


Figure 6: Titanium oxide nanoparticles interaction with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular trajectory of TiO₂ nanoparticles in HeLa cells. (b) Confocal microscopy image of HeLa cells exposed to TiO₂ nanoparticles where no morphological changes are observed. (c) TEM images of the pristine TiO₂ nanoparticles. (d) Cell survival after exposure to 50 µg/mL of TiO₂ nanoparticles. (e) Phase-contrast images of HeLa cells exposed to TiO₂ nanoparticles during 24, 48 and 72 h.

ZnO nanoparticles and nanowires

HeLa cells that are subjected to treatment with ZnO display a very acute phenotype of cytotoxicity due to the dissolution of the ZnO nanoparticles inside the lysosomes [57,62-64]. Cells need very small amounts of zinc and that is why they have exquisite membrane systems to control the entrance of films into the cytoplasm. When ZnO nanoparticles are incubated in medium containing serum proteins, they acquire a biocorona that the cell recognizes through its membrane receptors triggering receptor-mediated endocytosis. Once in the endosome, as the pH of these vesicles decrease and ZnO nanoparticles dissolve, releasing massive amounts of zinc ions in the vesicle that invade the cell cytoplasm. Within the cellular cytoplasm, there is a series of proteins that capture zinc transiently functioning as an intracellular buffering system (Figure 7(a)). Two of these proteins are actin and tubulin. The microtubules, built of nanotubes of tubulin units, are transformed into sharp sheets of tubulin upon zinc incorporation in their structure [57]. This causes the hardening and thickening of the microtubules that behave like “daggers” perforating the cell membrane causing immediate cell necrosis. This effect can be seen in the immunofluorescence image from Figure 7(d), left.

ZnO:Co²⁺ nanowires caused very similar effect to ZnO nanoparticles despite the different morphology and composition. These nanomaterials functionalised with serum proteins, interact with membrane receptors, trigger endocytosis and finally, dissolve in the lysosomes virtually identically to ZnO nanoparticles [57,65]. As observed for the ZnO nanoparticles, these nanowires produced changes in the microtubule and actin cytoskeleton (Figure 7(a)), stabilizing both cytoskeletal polymers and producing necrotic changes derived from the perforation of the cell membrane by the microtubules (Figure 7(d), right).

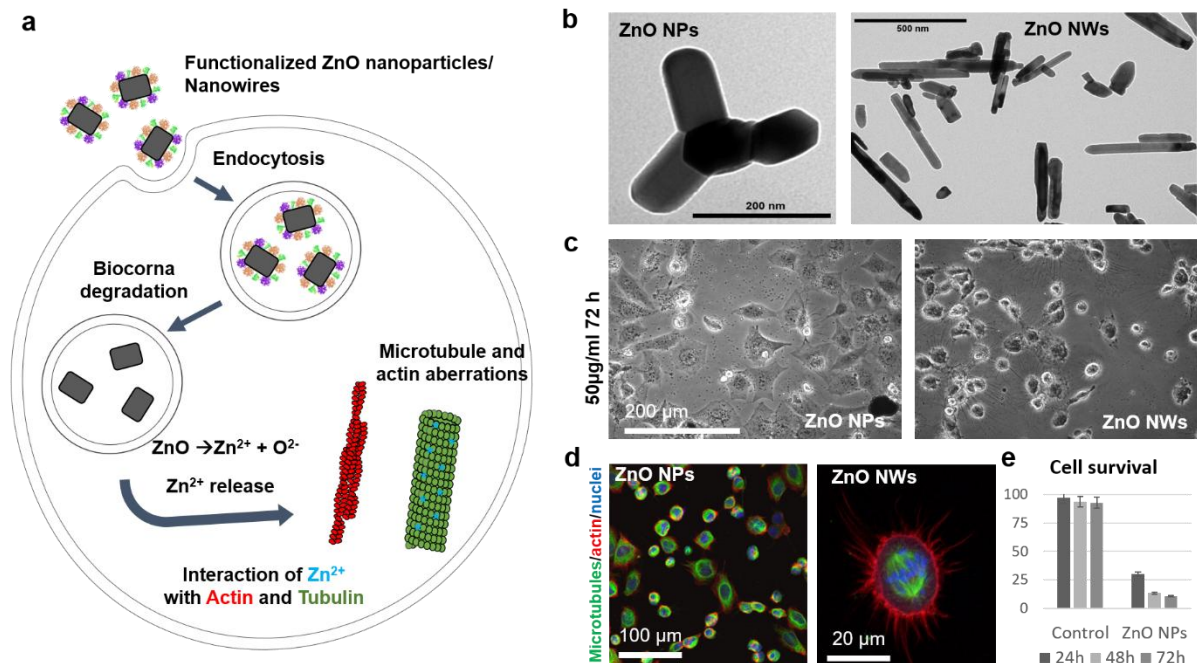


Figure 7: Interaction of ZnO nanoparticles and nanowires interaction with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular cycle of ZnO nanomaterials in HeLa cells. (b) TEM characterization of ZnO nanoparticles (left) and nanowires (right). (c) Phase-contrast images of HeLa cells exposed to 50 µg/mL of ZnO nanoparticles (left) and nanowires (right) during 72 h. (d) Confocal microscopy image demonstrating the cytotoxic effects of ZnO nanoparticles (left) and nanowires (right) of HeLa cells. Cytoskeletal abnormalities are clearly visible. (e) HeLa cells viability after ZnO nanoparticle exposure.

Conclusions

Our work shows how the toxicological effects of nanomaterials can result from both, the morphology of the nanomaterials and/or their composition. In this review we report several cases that illustrate these behaviours. In the case of carbon nanotubes and GO, it is the morphology rather than the composition the factor that triggers the cytotoxic response in the HeLa cells. However, this is not a universal dogma, for ZnO-based nanomaterials, morphology is less important than chemistry, and is its composition and their chemical properties what triggers the cytotoxic effect in that case. Also, this work demonstrates how nanomaterials can produce unpredictable consequences in human HeLa cells, even if we can know the composition and morphology of nanomaterials, a complete cytotoxic study should be performed in each case.

Our results show that although all employed nanomaterials interact with cells by receptor-mediated endocytosis, the route that they follow once inside the cell, it is not the same. As we can see, our study reinforces the idea that it is necessary to develop specific tests for each nanomaterial, since it is not possible to anticipate the cytotoxic effects and/or the interaction with cells and tissues.

This exhaustive study constitutes an extraordinary tool for the modelling of more complex structures, incorporating materials endowed with magnetic, optical or catalytic functionalities. In fact, the carbon nanotubes provide a high surface, which makes easier the adsorption of many different ligands, together with other porous or hollow materials like mesoporous SiO₂ or liposomes. Also, we can take advantage of other materials that are innocuous to these cells like TiO₂ in order to improve the biostability. This can increase the applications of these nanomaterials as drug delivery systems, therapy or diagnostic.

Nanomedicine and in particular the study of these interactions between nanomaterials and biological systems is a field in constant development and evolution that changes every day making the designs and the possibilities almost endless.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Funding Statement

This work has been supported by the Spanish MINECO and European Union FEDER under Projects ref. PI16/000496, the NanoBioApp Network Ref. MINECO-17-MAT2016-81955-REDT. CRL is funded by FJCI-2015-25306; LGL is funded by CD17/00105. We also thank IDIVAL for INNVAL15/16, INNVAL 17/11, PREVAL 16/03, 16/02, 17/04, and the Raman4clinics BMBS COST Actions BM1401 and TD1402.

Acknowledgments

We thank Débora Muñoz for her technical assistance. We are grateful to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit and the TEM Unit of the IDIVAL Institute.

Supplementary Materials

There is no Supplementary Materials.

References

- [1] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski and N. von Goetz, “Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 4, pp. 2242–2250, 2012.
- [2] S. W.P. Wijnhoven, W. J.G.M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W. H. De Jong, M. van Zijverden, A. J.A.M. Sips and R. E. Geertsma, “Nano-silver: a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment” *Nanotoxicology*, vol. 3, no. 2, pp. 109–138, 2009.
- [3] A. Ivask, K. Juganson, O. Bondarenko, M. Mortimer, V. Aruoja, K. Kasemets, I. Blinova, M. Heinlaan, V. Slaveykova and A. Kahru, “Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: A comparative review” *Nanotoxicology*, vol. 8, no. SUPPL. 1, pp. 57–71, 2014.
- [4] G. Brumfiel, “Consumer products leap aboard the nano bandwagon” *Nature*, vol. 440, no. 7082, p. 262, 2006.
- [5] E. Asmatulu, J. Twomey, and M. Overcash, “Life cycle and nano-products: End-of-life assessment” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, no. 3, p. 720, 2012.
- [6] G. Pulido-Reyes, F. Leganes, F. Fernández-Piñas, and R. Rosal, “Bio-nano interface and environment: A critical review” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 36, no. 12, pp. 3181–3193, 2017.
- [7] L. García-Hevia, R. Valiente, J. González, J. Fernández-Luna, J. C. Villegas, and M. L. Fanarraga, “Anti-Cancer Cytotoxic Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 15, pp. 1920–1929, 2015.
- [8] J. C. Villegas, L. Álvarez-Montes, L. Rodríguez-Fernández, J. González, R. Valiente, and M. L. Fanarraga, “Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering with Cell Migration and Phagocytosis” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 424–432, 2014.
- [9] L. Rodríguez-Fernández, R. Valiente, J. González, J. C. Villegas, and M. L. Fanarraga, “Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo, enhancing microtubule assembly and stabilization” *ACS Nano*, vol. 6, no. 8, pp. 6614–6625, 2012.
- [10] C. Bussy, K. T. Al-Jamal, J. Boczkowski, S. Lanone, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, “Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalised Carbon Nanotubes” *ACS Nano*, vol. 9, no. 8, pp. 7815–7830, 2015.
- [11] H. J. Forman and M. Torres, “Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling” in *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 166, no. 12 II, pp. S4–8, 2002.
- [12] S. Diment and P. Stahl, “Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands” *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 28, pp. 15311–15317, 1985.
- [13] M. L. Di Giorgio, S. Di Bucchianico, A. M. Ragnelli, P. Aimola, S. Santucci, and A. Poma, “Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cytotoxicity and electron microscopy” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 722, no. 1, pp. 20–31, 2011.
- [14] L. García-Hevia, J. C. Villegas, F. Fernández, I. Casafont, J. González, R. Valiente, M. L. Fanarraga, “Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Tumor Progression in a Mouse Model” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, no. 9, pp. 1080–1087, 2016.
- [15] L. García-Hevia, R. Valiente, J. L. Fernández-Luna, E. Flahaut, L. Rodríguez-Fernández, J. C. Villegas, J. González, M. L. Fanarraga, “Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 11, pp. 1640–1644, 2015.
- [16] J. Wang, P. Sun, Y. Bao, J. Liu, and L. An, “Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells” *Toxicol. Vitro*, vol. 25, no. 1, pp. 242–250, 2011.

- [17] E. S. Patchin, D. S. Anderson, R. M. Silva, D. L. Uyeminami, G. M. Scott, T. Guo, L. S. Van Winkle, K. E. Pinkerton, "Size-Dependent Deposition, Translocation, and Microglial Activation of Inhaled Silver Nanoparticles in the Rodent Nose and Brain" *Environ. Health Perspect.*, vol. 124, no. 12, pp. 1870-1875, 2016.
- [18] L. Belyanskaya, S. Weigel, C. Hirsch, U. Tobler, H. F. Krug, and P. Wick, "Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells" *Neurotoxicology*, vol. 30, no. 4, pp. 702-711, 2009.
- [19] C. Dong, R. Eldawud, L. M. Sargent, M. L. Kashon, D. Lowry, Y. Rojanasakulc and C. Zoica Dinu, "Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung epithelial cells in a time-dependent manner" *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, pp. 3983-3992, 2015.
- [20] S. K. Manna, S. Sarkar, J. Barr, K. Wise, E. V. Barrera, O. Jejelowo, A. C. Rice-Ficht, G. T. Ramesh, "Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor- κ B in Human Keratinocytes," *Nano. Lett.* vol. 5, no. 9, pp. 1676-1684, 2005.
- [21] L. García-Hevia, F. Fernández, C. Grávalos, A. García, J. C. Villegas, and M. L. Fanarraga, "Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 10, pp. 1581-1588, 2014.
- [22] B. D. Holt, P. a. Short, A. D. Rape, Y. L. Wang, M. F. Islam, and K. N. Dahl, "Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex Vivo" *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, pp. 4872-4878, 2010.
- [23] S. Y. Madani, F. Shabani, M. V. Dwek, and A. M. Seifalian, "Conjugation of quantum dots on carbon nanotubes for medical diagnosis and treatment" *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 941-950, 2013.
- [24] H. Ali-Boucetta, K. T. Al-Jamal, and K. Kostarelos, "Cytotoxic assessment of carbon nanotube interaction with cell cultures" *Methods Mol. Biol.*, vol. 726, pp. 299-312, 2011.
- [25] X. Li, Y. Peng, and X. Qu, "Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B-A transition in solution" *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 13, pp. 3670-3676, 2006.
- [26] J. Cveticanin, G. Joksic, A. Leskovac, S. Petrovic, A. V. Sobot, and O. Neskovic, "Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells" *Nanotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 015102, 2010.
- [27] F. Pampaloni and E. L. Florin, "Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials" *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 6, pp. 302-310, 2008.
- [28] J. R. Masters, "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly" *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 315-319, 2002.
- [29] J. J. Landry, P. T. Pyl, T. Rausch, T. Zichner, M. M. Tekkedil, A. M. Stütz, A. Jauch, R. S. Aiyar, G. Pau, N. Delhomme, J. Gagneur, J. O. Korbel, W. Huber, L. M. Steinmetz, "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line" *G3, Genes, Genomes, Genetics*, vol. 3, no. 8, pp. 1213-24, 2013.
- [30] D. Mittelman and J. H. Wilson, "The fractured genome of HeLa cells" *Genome Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 111, 2013.
- [31] S. Sato, A. Rancourt, Y. Sato, and M. S. Satoh, "Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny" *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 23328, 2016.
- [32] E. González-Domínguez, N. Iturrioz-Rodríguez, E. Padín-González, J. Villegas, L. García-Hevia, M. Pérez-Lorenzo, W. J. Parak, M. A. Correa-Duarte, M. L. Fanarraga, "Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible" *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6317-6328, 2017.
- [33] N. Iturrioz-Rodríguez, E. González-Domínguez, E. González-Lavado, L. Marín-Caba, B. Vaz, M. Pérez-Lorenzo, M. A. Correa-Duarte, M. L. Fanarraga, "A Biomimetic Escape Strategy for Cytoplasm Invasion by Synthetic Particles" *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 56, no. 44, pp. 13736-13740, 2017.
- [34] C. Renero-Lecuna, R. Martin-Rodriguez, J. A. Gonzalez, F. Rodriguez, G. Almonacid, A. Segura, V. Munoz-Sanjose, D. R. Gamelin, R. Valiente, "Photoluminescence in ZnO:Co²⁺ (0.01%-5%) Nanoparticles, Nanowires, Thin Films, and Single Crystals as a Function of Pressure and Temperature: Exploring Electron-Phonon Interactions" *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 2, pp. 1100-1107, 2014.
- [35] L. E. Greene, B. D. Yuhua, M. Law, D. Zitoun, and P. Yang, "Solution-Grown Zinc Oxide Nanowires" *Inorg Chem.*, vol. 45, no. 19, pp. 7535-7543, 2006.

- [36] L. E. Greene, M. Law, J. Goldberger, F. Kim, J. C. Johnson, Y. Zhang, R. J. Saykally, P. Yang, “Low-Temperature Wafer-Scale Production of ZnO Nanowire Arrays” *Angew Chem Int Ed Engl.*, vol. 42, no. 26, pp. 3031–3034, 2003.
- [37] M. F. De Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman, and a J. Hart, “Carbon nanotubes: present and future commercial applications.” *Science*, vol. 339, no. 6119, pp. 535–9, 2013.
- [38] N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, and H. Dai, “Nanotube molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 22, pp. 6850–6851, 2004.
- [39] P. N. Yaron, B. D. Holt, P. A. Short, M. Lösche, M. F. Islam, and K. N. Dahl, “Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration” *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 45, 2011.
- [40] C. Iancu, L. Mocan, C. Bele, A. I. Orza, F. A. Tabaran, C. Catoi, R. Stiufiuc, A. Stir, C. Matea, D. Iancu, L. Agoston-Coldea, F. Zaharie, T. Mocan, “Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalised with human serum albumin” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, no. 1, pp. 129–141, 2011.
- [41] C. Z. Dinu, S. S. Bale, G. Zhu, and J. S. Dordick, “Tubulin encapsulation of carbon nanotubes into functional hybrid assemblies” *Small*, vol. 5, no. 3, pp. 310–315, 2009.
- [42] R. F. Hamilton, Z. Wu, S. Mitra, P. K. Shaw, and A. Holian, “Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 10, no. 1, p. 57, 2013.
- [43] J. Muller, I. Decordier, P. H. Hoet, N. Lombaert, L. Thomassen, F. Huaux, D. Lison, M. Kirsch-Volders, “Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells” *Carcinogenesis*, vol. 29, no. 2, pp. 427–433, 2008.
- [44] L. Ding, J. Stilwell, T. Zhang, O. Elboudwarej, H. Jiang, J. P. Selegue, P. A. Cooke, J. W. Gray, F. F. Chen, “Molecular Characterization of the Cytotoxic Mechanism of Multiwall Carbon Nanotubes and Nano-Onions on Human Skin Fibroblast” *Nano Lett.*, vol. 5, no. 12, pp. 2448–2464, 2005.
- [45] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, A. Almalik, and N. M. Khashab, “Mesoporous Silica and Organosilica Nanoparticles : Physical Chemistry , Biosafety , Delivery Strategies , and Biomedical Applications” *Adv Healthc Mater.* vol. 7, pp. 1700831, 2018.
- [46] Q. Mu, D. L. Broughton, and B. Yan, “Endosomal Leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 12, pp. 4370–4375, 2009.
- [47] G. P. Kotchey, Y. Zhao, V. E. Kagan, and A. Star, “Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 15, pp. 1921–1932, 2013.
- [48] M. Zhang, M. Yang, C. Bussy, S. Iijima, K. Kostarelos, M. Yudasaka, “Biodegradation of carbon nanohorns in macrophage cells” *Nanoscale*, vol. 7, no. 7, pp. 2834–40, 2015.
- [49] A. R. Sureshbabu, R. Kurapati, J. Russier, C. Ménard-Moyon, I. Bartolini, M. Meneghetti, K. Kostarelos, A. Bianco, “Degradation-by-design: Surface modification with functional substrates that enhance the enzymatic degradation of carbon nanotubes” *Biomaterials*, vol. 72, pp. 20–28, 2015.
- [50] C. Bussy, C. Hadad, M. Prato, A. Bianco, and K. Kostarelos, “Intracellular degradation of chemically functionalised carbon nanotubes using a long-term primary microglial culture model” *Nanoscale*, vol. 8, no. 1, pp. 590–601, 2016.
- [51] M. M. Migliore, T. K. Vyas, R. B. Campbell, M. M. Amiji, and B. L. Waszczak, “Brain delivery of proteins by the intranasal route of administration: A comparison of cationic liposomes versus aqueous solution formulations” *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 4, pp. 1745–1761, 2010.
- [52] M. Przybylo, D. Glogocka, J. W. Dobrucki, K. Fraczewska, H. Podbielska, M. Kopaczynska, T. Borowik, M. Langner, “The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 85, pp. 39–46, 2016.
- [53] B. Chatin, M. Mével, J. Devallière, L. Dallet, T. Haudebourg, P. Peuziat, T. Colombani, M. Berchel, O. Lambert, A. Edelman, B. Pitard, “Liposome-based Formulation for Intracellular Delivery of Functional Proteins” *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 4, pp. e244, 2015.
- [54] X.-X. Chen, B. Cheng, Y. X. Yang, A. Cao, J. H. Liu, L. J. Du, Y. Liu, Y. Zhao, H. Wang,

- “Characterization and Preliminary Toxicity Assay of Nano-Titanium Dioxide Additive in Sugar-Coated Chewing Gum” *Small*, vol. 9, no. 9–10, pp. 1765–1774, 2013.
- [55] K. Donaldson and C. A. Poland, “Respiratory System” in *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, Elsevier, pp. 121–137, 2012.
- [56] R. K. Shukla, V. Sharma, A. K. Pandey, S. Singh, S. Sultana, and A. Dhawan, “ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 25, no. 1, pp. 231–241, 2011.
- [57] L. García-Hevia, R. Valiente, R. Martín-Rodríguez, C. Renero-Lecuna, J. González, L. Rodríguez-Fernández, F. Aguado, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, “Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis” *Nanoscale*, vol. 8, no. 21, pp. 10963–10973, 2016.
- [58] R. Cai, K. Hashimoto, K. Itoh, Y. Kubota, and A. Fujishima, “Photokilling of Malignant Cells with Ultrafine TiO₂ Powder” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 64, no. 4, pp. 1268–1273, 1991.
- [59] Y. Xu, M. T. Wei, H. D. Ou-Yang, S. G. Walker, H. Z. Wang, C. R. Gordon, S. Guterman, E. Zawacki, E. Applebaum, P. R. Brink, M. Rafailovich, T. Mironava, “Exposure to TiO₂ nanoparticles increases Staphylococcus aureus infection of HeLa cells” *J. Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1, p. 34, 2016.
- [60] Z. Li, L. Mi, P.-N. Wang, and J.-Y. Chen, “Study on the visible-light-induced photokilling effect of nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles on cancer cells” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, p. 356, 2011.
- [61] A. K. Jain, V. A. Senapati, D. Singh, K. Dubey, R. Maurya, and A. K. Pandey, “Impact of anatase titanium dioxide nanoparticles on mutagenic and genotoxic response in Chinese hamster lung fibroblast cells (V-79): The role of cellular uptake” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 105, pp. 127–139, 2017.
- [62] I. A. Mudunkotuwa, T. Rupasinghe, C.-M. Wu, and V. H. Grassian, “Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid” *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 396–403, 2012.
- [63] A. Sasidharan, P. Chandran, D. Menon, S. Raman, S. Nair, and M. Koyakutty, “Rapid dissolution of ZnO nanocrystals in acidic cancer microenvironment leading to preferential apoptosis” *Nanoscale*, vol. 3, no. 9, pp. 3657–3669, 2011.
- [64] J. Zhou, N. Xu, and Z. L. Wang, “Dissolving behavior and stability of ZnO wires in biofluids: A study on biodegradability and biocompatibility of ZnO nanostructures” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 18, pp. 2432–2435, 2006.
- [65] K. H. Müller, J. Kulkarni, M. Motskin, A. Goode, P. Winship, J. N. Skepper, M. P. Ryan, A. E. Porter, “pH-Dependent Toxicity of High Aspect Ratio ZnO Nanowires in Macrophages Due to Intracellular Dissolution,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 11, pp. 6767–6779, 2010.

