

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Valdecilla
Instituto de
Investigación
Sanitaria IDIVAL

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de un sistema de nanoencapsulación
terapéutico basado en partículas de sílice y
nanotubos de carbono**

Realizada por: Nerea Iturrioz Rodríguez

Dirigida por: Mónica López Fanarraga

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria
Santander 2019

Dña. **MÓNICA LÓPEZ FANARRAGA**, Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: Que Dña. Nerea Iturrioz Rodríguez ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Desarrollo de un sistema de nanoencapsulación terapéutico basado en partículas de sílice y nanotubos de carbono”.

Considero 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, expido el presente certificado en Santander, a 16 de abril del 2019.

Fdo. Mónica López Fanarraga

Esta Tesis ha sido financiada gracias a:

- Proyecto de investigación PI16/00496, AES 2016. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Fondos FEDER.
- Proyectos InnVal INNVAL16/15, INNVAL15/15 del Instituto de investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haberse hecho sin el trabajo y apoyo de muchas personas. Primero de todo querría agradecer este trabajo a mi directora de tesis, Mónica, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de cumplir este objetivo tan importante en mi vida. Gracias por haber estado ahí, dispuesta a enseñarme, guiarme y ayudarme a enfocar mi visión como investigadora. Como un buen grupo de investigación no sólo se compone de una persona, tengo que agradecer también al resto del grupo de Nanomedicina, sin los cuales no habría completado mi formación en este campo. Gracias a Rafa, Jesús, Rosa, Carmen, Fernando, Íñigo, Juan y Fidel.

Cuando pienso en el día a día de este camino (que a veces ha sido muy cuesta arriba), no me puedo olvidar de mis compañeros del laboratorio. Hemos compartido tantos momentos que no podría plasmarlos ni en un millón de folios. Millones de gracias a Eloisa, Esperanza, Elena, Lourdes, Lorena, Carlos, Debora y Ana, por vuestros consejos, no sólo a nivel profesional, sino también a nivel personal. Gracias por haber sido un pilar fundamental en este proceso. Por haber aguantado y haber resistido. Allá donde estemos, siempre nos tendremos.

Y, como no, este trabajo, no podría haberse hecho sin el apoyo fundamental de mis padres. Gracias a vosotros, por habérmelo enseñado todo. Porque sin vosotros no podría haber llegado donde estoy, ni ser quien soy. Y cómo no, gracias a mi hermano, por enseñarme desde pequeña que en la vida hay que cuestionárselo todo. Os quiero a los tres.

Gracias también por al apoyo y la fuerza de mis amigas Maitane, Alaine e Irene. Por hacerme desconectar y disfrutar de la vida no sólo en los buenos momentos sino también en momentos de flaqueza. Por haber estado y estar siempre a mi lado.

Por último, cuando pienso en toda mi estancia en Santander, no puedo evitar acordarme de Eric. Mi mejor amigo y compañero de vida. La persona que más me motiva e incita a ser mejor. Gracias por haber recorrido este camino a mi lado, impulsándome día tras día y haciéndome ver todo lo que confías en mí. Gracias por no fallarme y ser mi mayor motivación, porque nunca te rindes conmigo, por no juzgarme y porque sabes estar y ser la mejor versión de ti cada vez que lo necesito. Gracias por quererme tan bien. Espero devolvértelo siempre.

Gracias, por supuesto, al IDIVAL por su financiación durante estos años, a las compañeras de administración y a Fidel Madrazo del Servicio de Microscopía, por su excelente apoyo técnico.

Lista de abreviaturas

5-TAMRA	5-Carboxitetrametilrodamina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AO	Del inglés, <i>Acridine Orange</i> , naranja de acridina
APTS	(3-Aminopropil)triethoxisilano
BHE	Barrera hematoencefálica
CNT	Del inglés, <i>carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
ddH₂O	Agua doblemente destilada
DOX	Doxorrubicina
DWCNT	Del inglés, <i>doubled-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de pared doble
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
EtOH	Etanol
FBS	Del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i> , Suero Bovino Fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDP	Guanosín difosfato (GDP, del inglés <i>guanosine diphosphate</i>)
GTP	Guanosín trifosfato (GTP, del inglés <i>guanosine triphosphate</i>)
H2DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H₂O₂	Agua oxigenada
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HNO₃	Ácido nítrico
ICP-OES	Espectroscopia de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo

IMDM	Medio de cultivo Iscobe de Dulbecco Modificado
K₂HPO₄	Hidrógeno-ortofosfato dipotásico
MEM	Medio Esencial Mínimo
MRI	Del inglés, <i>magnetic resonance imaging</i> , imagen por resonancia magnética
MSP	Del inglés, <i>mesoporous silica particles</i> , partículas de sílice mesoporosa
MWCNT	Del inglés, <i>multi-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de pared múltiple
NA	Apertura Numérica
NaCl	Cloruro sódico
NH₃	Amoníaco
NH₄OH	Hidróxido de amonio
NaOH	Hidróxido sódico
o-MWCNT	Del inglés, <i>oxidized multi-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
PAMAM	Poli(amidoamina)
PAMAMOS	Poli(amidoamina-organosilicio)
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino-Tritón
PDDA	Cloruro de Poli(dialildimetilamonio)
PDI	Proteína disulfuro-isomerasa
PED	Polielectrolito degradable
PEG	Polietilenglicol
PF	Paraformaldehido
p-MWCNT	Del inglés, <i>pristine multi-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de pared múltiple prístinos
Poli-L-L	Poli-L-Lisina
PPI	Poli(propileno imina)
PSS	Poli(sodio 4 estirenosulfonato)

RBITC	Isotiocianato de Rodamina B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SERS	Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada, del inglés <i>Surface-Enhanced Raman Spectroscopy</i>
Si	Silicio
SiO₂	Óxido de silicio, sílice
SiO₂-CNT	Partículas de sílice con cubierta de nanotubos de carbono
SiO₂-CNT-PED	Partículas de sílice con cubierta de nanotubos de carbono unidos mediante un polielectrolito biodegradable
SWCNT	Del inglés, <i>single-walled carbon nanotubes</i> , nanotubos de carbono de pared simple
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEOS	Tetraetilortosilicato
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

ÍNDICE

RESUMEN	1-2
I. INTRODUCCIÓN.....	3-34
1. INTRODUCCIÓN.....	5-6
2. HISTORIA DE LOS SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	7-11
2.1. PRIMERA GENERACIÓN	7-8
2.2. SEGUNDA GENERACIÓN	8-10
2.3. TERCERA GENERACIÓN	11
3. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA	11-21
3.1. NANODIAGNÓSTICO	12-13
3.2. MEDICINA REGENERATIVA	13-14
3.3. TERAPIA CON NANOMATERIALES	14-18
3.4. NANOTERAPIA	18-21
3.4.1. Liberación controlada.....	19-20
3.4.2. Protección del fármaco	20
3.4.3. Especificidad	20-21
3.4.4. Menos toxicidad sistémica	21
4. NANOMATERIALES COMO SISTEMAS DE ENCAPSULAMIENTO	21-32
4.1. LIPOSOSMAS	21-22
4.2. DENDRÍMEROS	22-23
4.3. NANOGELES.....	23
4.4. PARTÍCULAS INORGÁNICAS	24-30
4.4.1. Nanopartículas de oro	24-25
4.4.2. Nanopartículas magnéticas	25-26
4.4.3. Nanopartículas de sílice.....	26-29
4.4.3.1. Características fisicoquímicas	26-27
4.4.3.2. Biocompatibilidad	27
4.4.3.3. Sistemas de liberación controlada.....	27-29
4.5. NANOTUBOS DE CARBONO	29-32

5. PROPIEDADES IDEALES DE LOS NANOSISTEMAS TERAPÉUTICOS	33-34
II. OBJETIVOS.....	35-38
1. OBJETIVO GENERAL	37
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39-60
1. NANOMATERIALES.....	41-46
1.1. NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED	41-42
1.2. PARTÍCULAS DE SÍLICE.....	42-48
1.2.1. Reactivos.....	42-43
1.2.2. Partículas de sílice amorfa.....	43-44
1.2.3. Partículas de sílice mesoporosa.....	45-46
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOMATERIALES.....	46-47
2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	46-47
2.2. MEDIDAS DE POTENCIAL Z	47
2.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	47
3. INTERACCIÓN DE LOS NANOMATERIALES	48-56
3.1. DISPERSIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN	48-49
3.1.1. Nanotubos de carbono.....	48
3.1.2. Partículas de sílice.....	49
3.2. CULTIVOS CELULARES	49
3.3. CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS	50
3.4. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	51-53
3.4.1. Azul de tripán	51
3.4.2. Citometría.....	51-52
3.4.3. Estrés oxidativo.....	53
3.5. MODELO ANIMAL	53-58
3.5.1. Modelo <i>in vivo</i> . Ratón	53
3.5.2. Generación de tumores. Alotrasplantes en ratones	53-55
3.6. MICROSCOPIA	56-59
3.6.1. Microscopía de contraste de fase.....	56

3.6.2. Microscopía de fluorescencia	56-58
3.6.2.1. Microscopía de epifluorescencia	57
3.6.2.2. Microscopía confocal.....	57-58
3.6.3. Microscopía electrónica de transmisión	58
3.6.4. Microscopía electrónica de barrido	59
4. ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO	59
5. ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA.....	59-60
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59-110
1. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	63
2. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS SiO ₂	64-65
3. INTERACCIÓN DE LAS PARTÍCULAS CON CÉLULAS HeLa.....	63-69
4. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR	69-76
5. ENTRADA AL CITOSOL DE LAS PARTÍCULAS SiO ₂ -CNT	77-82
6. CITOTOXICIDAD DE LAS PARTÍCULAS CON CNT	83-89
7. LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS CON CNT NO DISMINUYEN EL TAMAÑO TUMORAL	89-90
8. BIODEGRADABILIDAD DE LAS PARTÍCULAS SÍLICE	91-100
8.1. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA <i>IN VITRO</i>	92-95
8.2. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA <i>IN VIVO</i>	95-100
8.2.1. Degradación en macrófagos	95-97
8.2.2. Degradación en células HeLa.....	97-100
8.5.2.1. Degradación de partículas SiO ₂ -CNT-PED	100
9. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE UN COLORANTE COMO PRUEBA DE CONCEPTO	100-108
10. ESTUDIOS FUTUROS	108-109
V. CONCLUSIONES	111-114
VI. BIBLIOGRAFÍA	115-132

VII. ARTÍCULOS	133-136
----------------------	---------

RESUMEN

El fracaso clínico de muchas terapias potencialmente eficaces a menudo no se debe a la falta de efectividad de la terapia, sino a deficiencias en el direccionamiento celular y subcelular del sistema de administración. La nanotecnología nos ofrece la oportunidad de desarrollar nuevos sistemas de administración de medicamentos que podrían liberar la terapia específicamente de manera controlada en el lugar de acción, reduciendo así los efectos secundarios y aumentando la eficacia del fármaco. A lo largo de los últimos años se han ido desarrollando sistemas de transporte basados en diferentes nanomateriales como liposomas, dendrímeros, partículas inorgánicas y nanotubos de carbono, entre otros. Las desventajas de cada uno de estos nanomateriales hacen que no haya un sistema perfecto que cumpla con las siguientes características: que la síntesis del sistema sea reproducible con un tamaño y forma del material adaptable, que tenga gran capacidad de carga, que proteja la terapia frente a la inactivación en su transporte, que su superficie pueda ser funcionalizada de manera estable para el direccionamiento tanto celular como subcelular, que la liberación del fármaco pueda controlarse, y que el nanomaterial sea biocompatible y biodegradable. Por eso, en nuestro laboratorio se propone la idea de desarrollar un sistema multiestructurado y biosintético basado en nanotubos de carbono y partículas de sílice como una posible solución a dicha problemática.

Con este diseño se van a poder encapsular diferentes terapias en el núcleo de sílice. Además, la cubierta de nanotubos de carbono multipared oxidados van a poder recubrirse de proteínas para su direccionamiento. Una vez ensamblado y estudiado el sistema propuesto hemos visto que tiene propiedades muy interesantes y únicas. El recubrimiento de los nanotubos de carbono hace que las partículas sean endocitadas de manera más rápida. Además, este recubrimiento hace que las partículas de sílice puedan ser liberadas al citoplasma. El escape endolisosomal de las partículas puede ser de vital importancia cuando se requiera el transporte de fármacos sensibles al pH ácido, debido a que se va a poder evitar la degradación del fármaco en la ruta endolisosomal. A lo largo de este trabajo se ha estudiado también, el posible efecto citotóxico de este sistema. De esta manera, hemos observado que, por un lado, dicho escape endolisosomal no genera toxicidad celular, y que, por otro lado, la estructura de sílice y nanotubos de carbono, *per se*, tampoco es citotóxica. Asimismo, otro de los objetivos de esta tesis, es demostrar la degradación del sistema. El recubrimiento de las partículas se hizo de nanotubos de carbono oxidados, puesto que en trabajos anteriores del grupo se ha demostrado la degradación de los mismos tanto en cultivos celulares como en tumores. Para estudiar la degradación de las partículas de sílice se utilizaron cultivos de macrófagos de ratón y células HeLa, donde se demostró dicho fenómeno en ambos tipos celulares. Además, para estudiar la eficiencia del sistema en la administración de fármacos se encapsuló, como

prueba de concepto, naranja de acridina. Mediante el uso de diferentes polielectrolitos hemos observado cómo la liberación varía, por lo que, hemos demostrado cómo mediante el recubrimiento de las partículas podemos controlar la degradación y liberación de nuestro sistema. Así, mientras el recubrimiento de nanotubos de carbono otorga a las partículas la capacidad de escapar de las membranas endolisosómicas, nuestros estudios también demuestran la importancia de los diferentes recubrimientos poliméricos de las partículas de sílice en la liberación. Estos datos indican cómo controlando la naturaleza del recubrimiento de estos sistemas podemos determinar el tiempo y la orientación subcelular de la liberación terapéutica *in vivo*.

I. Introducción

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”.

Marie Curie

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas para el tratamiento de enfermedades tan incidentes como las asociadas al sistema nervioso central o el cáncer es que los fármacos utilizados no tienen la capacidad de dirigirse específicamente a su célula diana. El fracaso clínico de muchas terapias potencialmente efectivas a menudo no se debe a la falta de efectividad del fármaco, sino a deficiencias en el método de administración de dicha terapia. Asimismo, en los sistemas de administración de fármacos tradicionales, como la ingestión oral o inyección intravenosa, el medicamento se distribuye por todo el cuerpo a través de la circulación sanguínea, por lo que sólo una pequeña parte de la terapia alcanza el órgano o tejido diana. Cuando un medicamento se administra por vía oral, éste se disuelve en la luz intestinal y se permeabiliza a través de los enterocitos para poder alcanzar la circulación sanguínea. Sin embargo, la concentración final del fármaco en el tejido o célula diana puede verse comprometida debido a diferentes razones: por un lado, ciertos medicamentos no entran a los enterocitos debido a su baja permeabilidad. Además, hay fármacos que aunque ingresen en el enterocito, pueden volver a fluir hacia la luz intestinal, y por otro lado, hay medicamentos que aun habiendo llegado al sistema sanguíneo, pueden ser absorbidos por el hígado y pueden ser secretados de nuevo a la luz intestinal a través de la excreción biliar (ver **figura 1**). Este paso por el hígado es muy importante, puesto que implica una primera metabolización del fármaco, disminuyendo la biodisponibilidad del mismo. Debido a este gran inconveniente, en los últimos años se ha propuesto la administración de fármacos dirigida, donde el medicamento alcanza el tejido de interés, reduciendo la concentración de éste en los tejidos restantes y generando menos toxicidad.

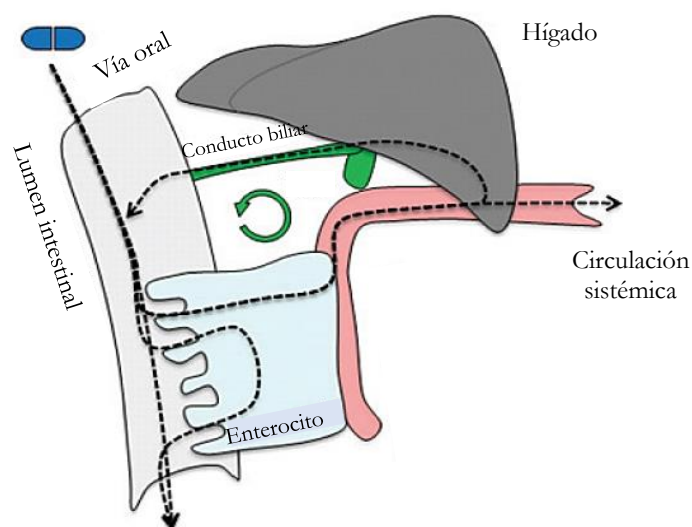


Figura 1. Esquema de los procesos que ocurren durante la absorción oral de medicamentos

El tratamiento de las enfermedades del sistema nervioso central es particularmente difícil, puesto que en general, la mayoría de las terapias son administradas de forma sistémica a través de la circulación sanguínea, dónde existe una variedad de obstáculos, como la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (Dong, 2018), que a menudo impiden que el medicamento llegue a su destino (Misra *et al*, 2003; Karim *et al*, 2016; Caruso *et al*, 2017; Dong, 2018). Por lo tanto, para poder llegar al nivel terapéutico efectivo, es necesario elevar la dosis de los medicamentos o realizar una administración extendida de los mismos, aumentando significativamente el riesgo de toxicidad sistémica. Es por ello que muchos estudios recientes se han centrado en el desarrollo de nuevas estrategias para aumentar la eficiencia en la administración de los fármacos.

En el caso del cáncer, los métodos principales que utiliza la medicina actual en su lucha son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, siendo esta última el tratamiento más común (Lai *et al*, 2012). Los fármacos utilizados en la quimioterapia reciben el nombre de antitumorales o antineoplásicos y pueden administrarse por dos vías diferentes: intravenosa u oral, siendo la intravenosa la más común. De esta manera, los fármacos antineoplásicos circulan por el torrente sanguíneo bloqueando la proliferación celular y dañando directamente a todas las células que están dividiéndose de forma activa, tanto las células tumorales como las normales. En general las células cancerígenas son las que más crecen y se dividen, por lo que son las más susceptibles a estos 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. Es por eso, que, al igual que se necesita una administración dirigida al sistema nervioso, también es necesaria una terapia dirigida a las células tumorales para poder prevenir la alta toxicidad del tratamiento a nivel sistémico, así como para aumentar la concentración de fármaco en el tejido diana.

Por todo lo comentado, sabemos que urge la necesidad de desarrollar sistemas de transporte dirigidos que sean capaces de liberar el fármaco o la terapia en el lugar y momento adecuados para poder combatir enfermedades tan importantes como las que afectan al sistema nervioso y el cáncer, entre otras. Para poder llevar a cabo este objetivo es necesario encapsular dichos fármacos en un sistema de transporte.

2. HISTORIA DE LOS SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS

La encapsulación de fármacos nos va a permitir mejorar la eficacia de la terapia y la calidad de vida de los pacientes, debido a que vamos a poder administrar el tratamiento de manera más específica y a demanda. Para ello es importante la selección del sistema de transporte y liberación que se vaya a utilizar. Aunque el primer sistema de transporte de fármacos se usó por primera vez en forma de pastillas recubiertas (Szycher, 1986) hace 1500 años, en la época Grecorromana, la historia moderna de la tecnología de administración de fármacos comenzó a mitad del siglo XX y se pueden diferenciar 3 generaciones diferentes.

2.1. PRIMERA GENERACIÓN

La **primera generación** de sistemas de liberación de fármacos comenzó en la década de los años 50 (**figura 2**), con la microencapsulación, que simplificaba la administración y facilitaba el efecto terapéutico (Rosen & Abribat, 2005). Hasta entonces, los medicamentos se formulaban en píldoras o cápsulas de gelatina y recubrimientos entéricos o azucarados (Szycher, 1986; Warner, 1902) que liberaban el medicamento cargado inmediatamente después de ponerse en contacto con el agua y sin ninguna capacidad de controlar su cinética de liberación. Los laboratorios Smith Kline y French (Helfand & Cowen, 1983) desarrollaron la primera microencapsulación bajo el nombre de Spansule®. Estas cápsulas, con cientos de micro-gránulos cubiertos con ceras hidrosolubles de diferentes grosores, se crearon con el fin de controlar la liberación de la dextroanfetamina. Durante las décadas de los años 50 y 60, se definieron diferentes mecanismos como: la disolución, la difusión, la osmosis y los mecanismos basados en intercambio de iones, dando lugar al desarrollo de los fundamentos básicos de la liberación

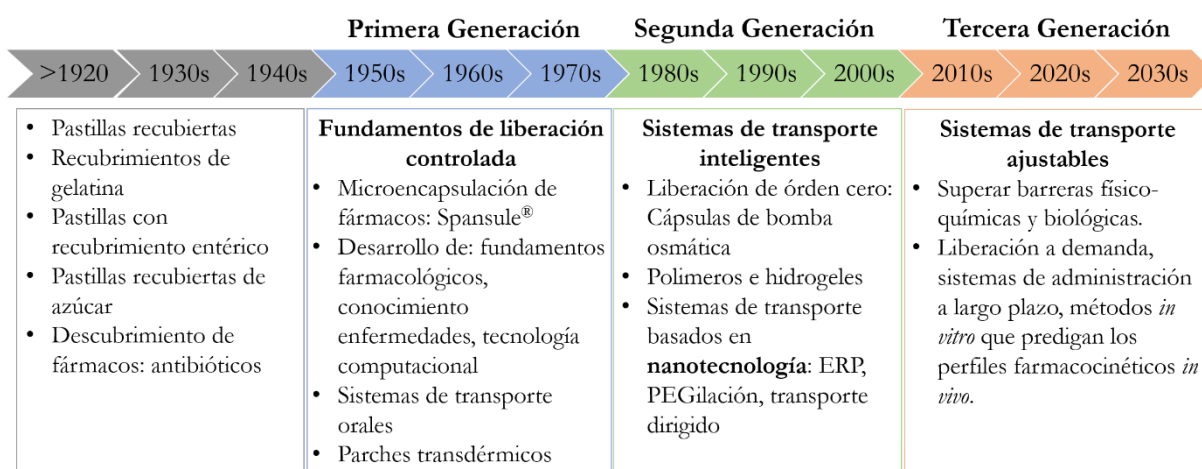


Figura 2. Representación esquemática de la historia de los sistemas de transporte de fármacos.

controlada de fármacos. Además, a lo largo de esta década, se empezaron a usar tanto polímeros como lípidos para el transporte de fármacos liposolubles e hidrosolubles (Rosen & Abribat, 2005). Se establecieron también, conceptos como la farmacocinética y farmacodinámica (Levy, 1965). Durante esta primera generación de sistemas de encapsulación, la biotecnología y la biología molecular empezaron a tener relevancia en el campo de los sistemas de transporte, mejorando el conocimiento básico de diferentes enfermedades y desarrollando así terapias basadas en proteínas. Además del desarrollo de la biología molecular, durante la década de los años 70, la tecnología computacional emergió, dando como resultado la identificación de nuevos compuestos mediante la química combinatoria, software predictivo, *high throughput screening*, etc. (Rosen & Abribat, 2005). Todos estos avances en el conocimiento y la tecnología durante esta primera generación dieron lugar al desarrollo de fórmulas orales (*once-a-day* y *twice-a-day*) y parches transdérmicos (*once-a-day* y *once-a-week*) (Park, 2014). De esta manera, a finales de los años 70 se introdujo en el mercado el primer sistema de administración y liberación transdérmica (Zaffaroni, 1974). Después de este primer parche, se comercializaron diferentes para diversos usos como: parches de nitroglicerina para el tratamiento de la angina, parches de nicotina para dejar de fumar o parches de vitamina B12, entre otros (Janapareddi *et al*, 2016).

2.2. SEGUNDA GENERACIÓN

Entre el final de la primera generación y el comienzo de la **segunda**, la investigación en el campo se centró en crear un sistema de transporte de fármacos continuo o "*flat*", con una liberación a una tasa constante, también denominado "sistema de entrega de orden cero" (Theeuwes, 1975; Theeuwes *et al*, 1983). Se pensó que este método reduciría los efectos secundarios asociados con los picos producidos por las formulaciones orales de liberación inmediata utilizadas hasta el momento (Rosen & Abribat, 2005) (**figura 3**). Aunque la primera patente de estas formulaciones se publicó en 1974 (Theeuwes & Higuchi, 1972), la mayoría de estos dispositivos se desarrollaron a principios de la década de los 80 y continuaron en los años 90 (Janapareddi *et al*, 2016). Estos primeros sistemas de transporte de orden cero consistían en cápsulas de bombas osmóticas con un polímero a modo de membrana semipermeable que controlaba la velocidad de administración del medicamento encapsulado (Malaterre *et al*, 2009). La liberación del fármaco se controlaba a través de partículas de diferentes grosores, como se hizo en la primera generación con la Spansule (Janapareddi *et al*, 2016). Tras una década de investigación exhaustiva en sistemas de transporte de fármacos de orden cero, se observó por un lado, que estos dispositivos no mantenían una concentración constante del fármaco en sangre y por otro, que esta concentración constante no era necesaria para la mayoría de los fármacos. De hecho, la eficacia del fármaco era igual siempre que esta concentración estuviera por encima

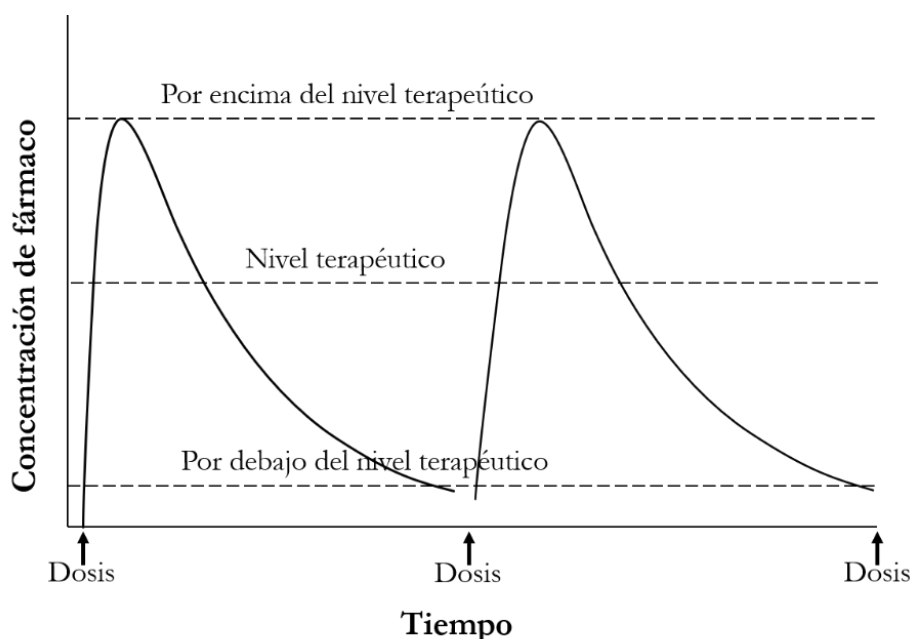


Figura 3. Patrón de concentración de fármacos a partir de formulaciones orales tradicionales.

del nivel mínimo efectivo y por debajo de la máxima concentración tóxica (**figura 3**). Comprender este segundo enfoque, ayudó a aumentar la flexibilidad en el diseño de futuros dispositivos (Park, 2014). Durante el desarrollo de esta segunda generación, además, empezaron a utilizarse polímeros e hidrogeles inteligentes capaces de activarse ante un cambio en el ambiente como el pH, temperatura o niveles de glucosa, entre otros (Hoffman *et al*, 2008; Park, 2014).

Durante la década de los 90, aunque los polímeros inteligentes y los hidrogeles seguían evolucionando, comenzaron a desarrollarse los transportadores basados en nanotecnología. Así, se sintetizaron micelas poliméricas, dendrímeros y nanopartículas basadas en polímeros biodegradables, entre otros (Hoffman *et al*, 2008; Park, 2014), para poder mejorar los sistemas de administración de terapias génicas y los sistemas dirigidos a tumores (Park, 2014). El comienzo de esta era nano fue posible debido al desarrollo principalmente de tres ideas clave: la “PEGilación” (Davis, 2002), el transporte activo o dirigido (Duncan & Kopeček, 1984; Duncan, 2003) y el “efecto de permeabilidad y retención aumentada” (EPR, del inglés *enhanced permeability and retention effect*) (Iwai *et al*, 1984).

El primer concepto, la PEGilación, se refiere a la conjugación de polietilenglicol (PEG) o bien al transportador o bien al fármaco, para la mejora de la biodisponibilidad y la estabilidad del tratamiento (Davis, 2002).

El segundo concepto, el transporte activo o dirigido, se refiere a la unión de ligandos (anticuerpos, proteínas o moléculas pequeñas) con el nanodispositivo para crear interacciones

del tipo antígeno-anticuerpo o ligando-receptor para generar así una distribución más específica (Yokoyama, 2005). Este concepto fue propuesto por primera vez por Ehrlich en el siglo XIX con la idea de "la bala mágica" (Strebhardt & Ullrich, 2008). Aunque *a priori* pueda parecer una idea sencilla, solo han tenido éxito un número reducido de casos (Sugiyama, 1996).

El último concepto, pero no el menos importante, el EPR fue propuesto por Maeda y Matsumura (Matsumura & Maeda, 1986; Maeda, 2001) y describe cómo la permeabilidad vascular en tejidos tumorales es mayor que en tejidos sanos, y cómo así, nanoestructuras pueden atravesar el tejido selectivamente desde los vasos sanguíneos hasta el tejido enfermo (**figura 4**). Normalmente, cuando un tumor alcanza un cierto tamaño, la vasculatura normal presente en el órgano tumoral no puede irrigar toda la masa celular. Este hecho genera una hipoxia intratumoral que desencadena la segregación de factores de crecimiento que activan así la angiogénesis (Bates *et al*, 2002). Este proceso genera vasos sanguíneos irregulares que muestran un epitelio discontinuo con una membrana basal ausente (Jain & Stylianopoulos, 2010). Cuando los componentes sanguíneos alcanzan estas redes vasculares anormales y discontinuas, las fenestraciones entre las células ofrecen poca resistencia a la extravasación en el interior del tumor (Bertrand *et al*, 2014). Las partículas o moléculas menores de 4 nm pueden difundir a través del endotelio capilar de vuelta a la circulación sanguínea y reabsorberse (Noguchi *et al*, 1998). Sin embargo, las macromoléculas y los nanomateriales no regresan naturalmente a los vasos sanguíneos, lo que resulta en su acumulación en el espacio tumoral perivascular, posibilitando el uso de nanomateriales como sistemas de transporte.

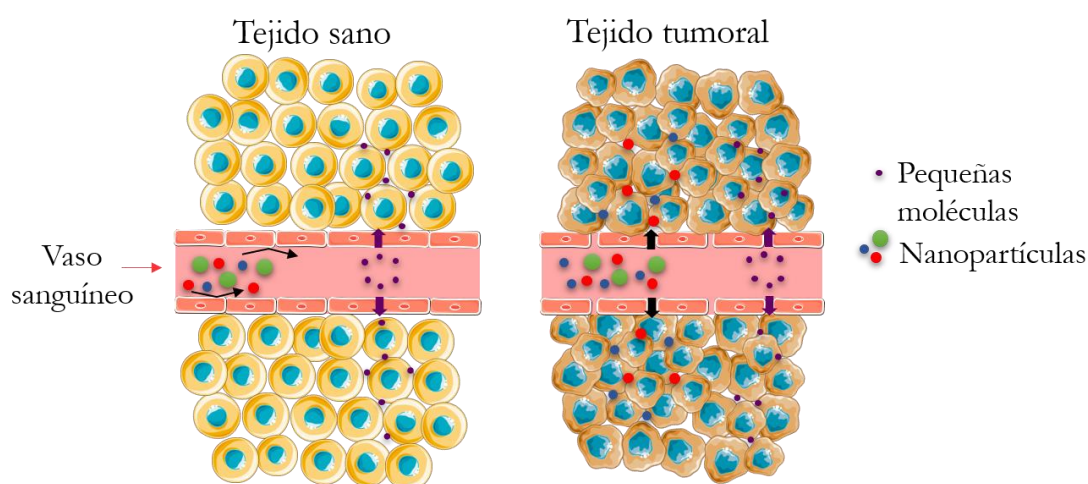


Figura 4. Diagrama comparando el efecto de permeabilidad y retención aumentada de un tejido tumoral frente a un tejido sano.

2.3. TERCERA GENERACIÓN

A lo largo de las dos generaciones anteriores ha habido diferentes problemas que solventar. Así, la primera generación de tecnologías de administración y liberación de fármacos quiso solucionar los problemas fisicoquímicos, mientras que la segunda luchó contra las barreras biológicas. Hoy en día, aunque los sistemas pueden hacerse con propiedades fisicoquímicas controlables, no pueden superar, en muchos casos, las barreras biológicas. Por lo tanto, los sistemas de administración de fármacos de la **tercera generación** deben superar tanto las barreras fisicoquímicas como biológicas. Dentro de estos problemas podemos diferenciar como barreras fisicoquímicas la escasa solubilidad en agua de algunos fármacos, el gran peso molecular de los fármacos peptídicos y proteicos o la dificultad para controlar la cinética de liberación del fármaco. En cuanto a las barreras biológicas, la más importante que ha de superarse incluye la distribución de los sistemas de administración de fármacos a un sitio específico del cuerpo. Los avances que tendrán lugar en los próximos 30 años, a lo largo de esta tercera generación, no son fáciles de predecir. Los sistemas de transporte de terapias serán necesarios para poder dar solución a problemas como: i) la diabetes, con el desarrollo de un sistema de liberación de insulina a demanda, ii) el cáncer, con nuevos sistemas dirigibles y específicos que transporten diferentes terapias como material genético y fármacos, iii) enfermedades crónicas, con sistemas de administración a largo plazo y iv) el desarrollo de métodos avanzados *in vitro* que puedan predecir resultados precisos *in vivo* en humanos (Park, 2014). La nanotecnología por tanto, puede jugar un papel importante en la resolución de dichos problemas.

3. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

En 1959, en una ponencia titulada “*There is plenty of room at the bottom*” (hay mucho espacio ahí abajo), 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 las 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. Sin embargo, no fue hasta 1974 (Taniguchi, 1974) cuándo el término nanotecnología fue definido por primera vez como el procesamiento de: separación, consolidación y deformación de materiales a nivel atómico o molecular.

Asimismo, se puede definir la nanociencia como la disciplina encargada del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos que posean al menos una de sus dimensiones en escala nanométrica (Boulaiz *et al*, 2011). El prefijo *nano-* hace referencia a la

milmillonésima parte de un metro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$). Así, el rango de tamaño de estos nanomateriales suele ser de 1 a 100 nm en al menos una de sus dimensiones, aunque a menudo se extiende para incluir materiales de tamaño inferior a $1\text{ }\mu\text{m}$. Como se observa en la **figura 5** estos tamaños se corresponden con muchas estructuras biológicas. De esta manera, los nanomateriales pueden interactuar con proteínas, ADN, etc. interfiriendo con numerosos procesos biológicos (Jackson *et al*, 2017; García-Hevia *et al*, 2014, 2016b).

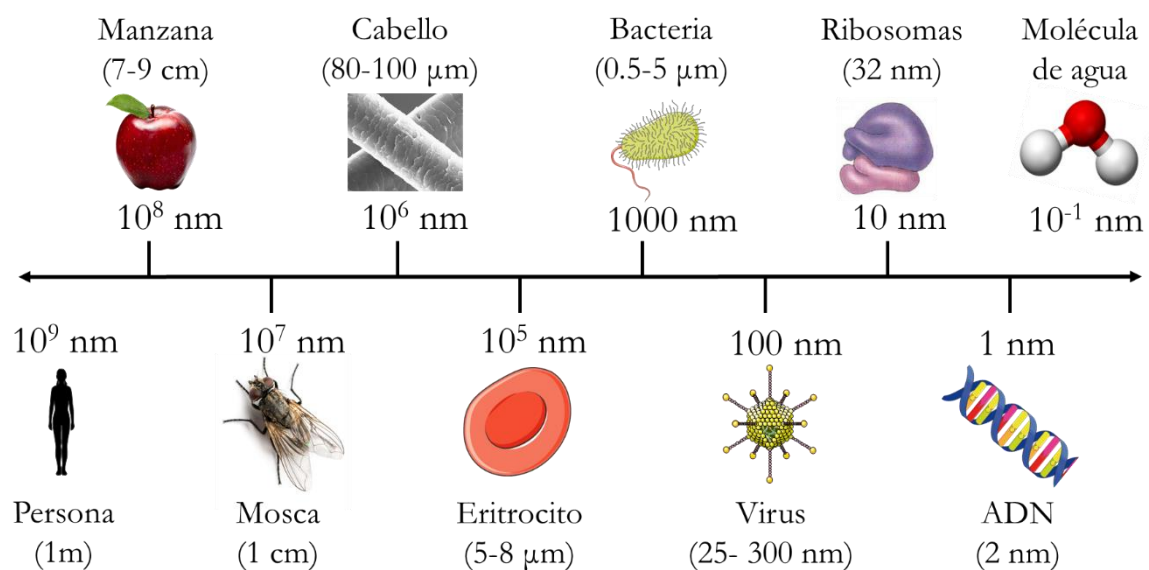


Figura 5. Escala representativa de diferentes tamaños relacionados con el contexto biológico.

De esta manera, se puede definir la nanomedicina como la ciencia que estudia la nanotecnología aplicada a la medicina, siendo su principal objetivo monitorizar, controlar, sintetizar, reparar y mejorar los sistemas biológicos, trabajando desde un nivel molecular mediante nano-dispositivos, para obtener en última instancia, la mejora del paciente (Lechuga, 2011). Se pueden definir, así, cuatro áreas mayoritarias de estudio dentro de la nanomedicina: el nanodiagnóstico, la medicina regenerativa, la terapia y la liberación controlada de fármacos.

3.1. NANODIAGNÓSTICO

El objetivo de esta área de investigación consiste en la identificación de enfermedades en su estadio inicial a nivel celular o molecular mediante el uso de nanodispositivos y sistemas de contraste. Una identificación temprana de una enfermedad permitiría una rápida capacidad de respuesta y la inmediata aplicación del tratamiento adecuado, ofreciendo así mayores posibilidades de supervivencia o curación para el paciente. Actualmente, la tecnología de diagnóstico sólo puede detectar algunos tipos de enfermedades cuando éstas se encuentran en

un estadio de la enfermedad muy avanzado. El uso de la nanotecnología con fines de diagnóstico clínico se desarrolló para satisfacer la demanda de mayor sensibilidad en los diagnósticos clínicos y la detección temprana de enfermedades (Boulaiz *et al*, 2011).

Esta aplicación de micro y nanobiotecnología en el diagnóstico médico se puede subdividir a su vez, en dos grandes categorías que pueden verse en la **tabla 1**: dispositivos de diagnóstico *in vitro* (como nanobiosensores, microarrays y Lab-on-a-chip) e imágenes *in vivo*. Por un lado, el diagnóstico *in vitro* requiere muestras muy reducidas de fluidos corporales o de tejidos, a partir de los cuales se puede llevar a cabo una detección específica (de patógenos o defectos genéticos, entre otros) en tiempos muy cortos, con gran precisión y sensibilidad. Por otro lado, para el diagnóstico *in vivo* se requiere la administración del nanodispositivo en el interior del organismo para poder identificar e idealmente cuantificar, por ejemplo, la presencia de un determinado patógeno o de células cancerígenas. Por tanto, el diagnóstico *in vivo* necesita que el material del dispositivo sea biocompatible, eficaz y con el número mínimo de efectos secundarios.

Tabla 1. Tabla resumen de los sistemas de nanodiagnóstico más desarrollados, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Nanodiagnóstico <i>in vitro</i>	Nanodiagnóstico <i>in vivo</i>
Nanobiosensores	Resonancia magnética nuclear
Biochips genéticos y proteómicos	Espectroscopía y fluorescencia
Lab-on-a-chip	Microscopía electrónica y atómica
	Marcadores y agentes de contraste (puntos cuánticos, nanopartículas magnéticas y metálicas)

3.2. MEDICINA REGENERATIVA

La medicina regenerativa sirve para reparar o sustituir tejidos y órganos enfermos o dañados mediante la aplicación de métodos procedentes de la terapia génica, la terapia celular, la dosificación de sustancias biorregenerativas y la ingeniería de tejidos, utilizando la estimulación de los propios mecanismos reparadores del cuerpo humano. Desde la nanomedicina se intenta por un lado, producir nuevos materiales y sistemas de soporte, utilizar células madre embrionarias y adultas y además, producir moléculas que sirvan como señales de diferenciación celular. De esta manera, la nanotecnología puede ser crucial para el desarrollo de nuevos materiales y técnicas que permitan una integración de los tejidos de forma más eficiente para la regeneración tisular (Lechuga, 2011). Aunque no sea fácil encontrar materiales que permitan la

fabricación de estructuras que mantengan activo el órgano afectado mientras se regenera la zona dañada, se está trabajando con diferentes nanomateriales como polímeros biodegradables (Chung *et al*, 2017; Nosenko *et al*, 2018) o nanocomposites (Cao *et al*, 2018; Bramhill *et al*, 2017), entre otros. El objetivo a alcanzar de la nanotecnología aplicada a la medicina regenerativa consiste, por tanto, en el desarrollo de biomateriales con capacidad de imitar a la matriz extracelular, constituyendo un auténtico soporte, idéntico al que aparece de forma natural en las células, sobre el que pueden crecer las células progenitoras para posteriormente implantarlo en el paciente y así reparar o sustituir el órgano dañado.

En resumen, la aplicación de la nanotecnología tiene un potencial considerable en las terapias basadas en células para la medicina regenerativa, especialmente en la localización, reclutamiento y etiquetado de células madre para comenzar el proceso de regeneración (Atala *et al*, 2011).

3.3. TERAPIA CON NANOMATERIALES

Los nanomateriales, además de ser buenas herramientas para el diagnóstico y la medicina regenerativa, pueden utilizarse también como agentes terapéuticos. Las nanopartículas magnéticas y metálicas (de oro), por ejemplo, se pueden calentar mediante la aplicación de un campo magnético de baja intensidad o por irradiación con luz, respectivamente (Huang *et al*, 2006; Riley & Day, 2017). A pesar de que los mecanismos son diferentes, si estas partículas se administran a células tumorales, su calentamiento provocaría la destrucción de las células por hipertermia (Beik *et al*, 2016; Ferreira *et al*, 2017).

Además de este mecanismo, también se ha descrito un efecto antitumoral intrínseco de diferentes nanomateriales como el que fue descrito por nuestro laboratorio para los nanotubos de carbono (CNT; del inglés *carbon nanotube*) (García-Hevia *et al*, 2015b, 2014; Bellucci *et al*, 2012), entre otros. Los nanotubos de carbono presentan propiedades biomiméticas con los microtúbulos (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012). Los microtúbulos son uno de los filamentos del citoesqueleto, esenciales en todas las células eucariotas, que tienen una disposición radial desde el centrosoma celular. Estos juegan un papel importante en muchas funciones celulares, entre las que se pueden destacar: el transporte intracelular de organelas y su localización, la biomecánica durante el movimiento y división celular y el ensamblaje de estructuras como cilios y flagelos (Desai & Mitchison, 1997). Además de esto, están formados por heterodímeros de α - y β -tubulina, que se van uniendo formando protofilamentos (Weisenberg, 1972). Trece de estos protofilamentos (Evans *et al*, 1985) se asocian lateralmente para dar lugar al microtúbulo que posee unos 24-25 nm de diámetro externo (Nogales *et al*, 1998) y 15-17 nm de diámetro interno (Amos & Baker, 1979) (**figura 6**).

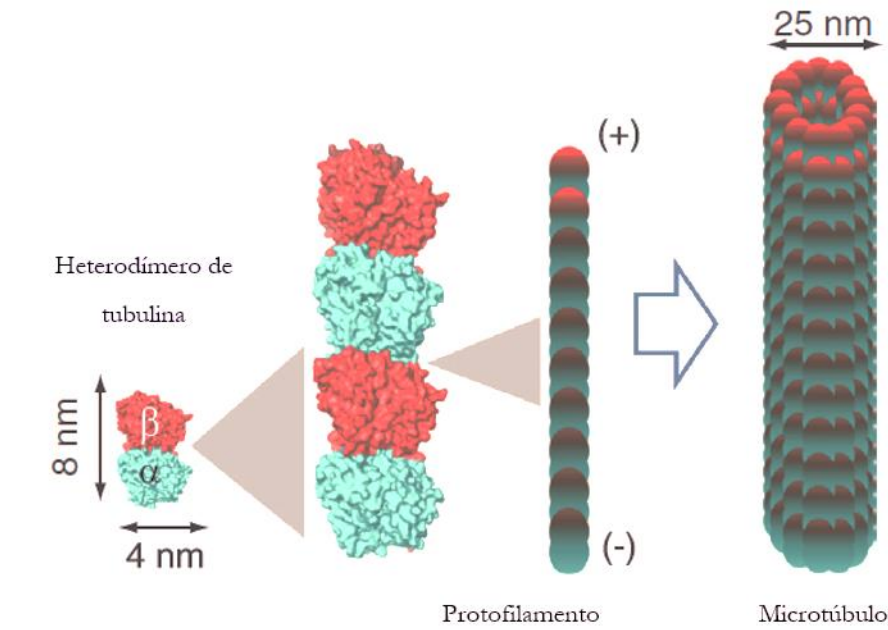


Figura 6. Estructura de los microtúbulos. Los microtúbulos están formados por la unión de 13 protofilamentos proteicos, a su vez constituidos por la asociación de dos polipéptidos diferentes, α -tubulina (azul) y β -tubulina (rojo). Adaptación de (García-Hervía et al, 2014).

Una de las características más importantes de los microtúbulos es que son muy dinámicos y están constantemente polimerizando y despolimerizándose. La incorporación de nuevos dímeros de tubulina al extremo (+) hace que el microtúbulo crezca en longitud. Los dímeros de tubulina libres se encuentran unidos a dos moléculas de guanosín trifosfato (GTP, del inglés *guanosine triphosphate*). Cuando se unen a un microtúbulo se produce la hidrólisis del GTPs (a guanosín difosfato o GDP, del inglés, *guanosine diphosphate*) unido a la β -tubulina. 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, llegará un momento en el que en el extremo positivo del microtúbulo solo habrá dímeros de tubulina-GDP, lo que hará que los protofilamentos se adhieran inestablemente entre ellos, desencadenándose la despolimerización abrupta del mismo y la liberación de los dímeros de tubulina-GDP al citosol. Esto provoca una despolimerización rápida del microtúbulo conocida como "catástrofe microtubular. Los ciclos de crecimiento-catástrofe configuran la llamada inestabilidad dinámica de los microtúbulos, imprescindible para su función biológica. Si por cualquier motivo se estabiliza el extremo positivo y aumenta la unión de dímeros-GTP-GTP, el microtúbulo volverá a crecer (**figura 7**). Los dímeros de tubulina-GTP-GDP que quedan libres intercambian el GDP por GTP y por tanto pueden volver a unirse de nuevo (Carlier & Pantaloni, 1981; Desai & Mitchison, 1997) (**figura 7**).

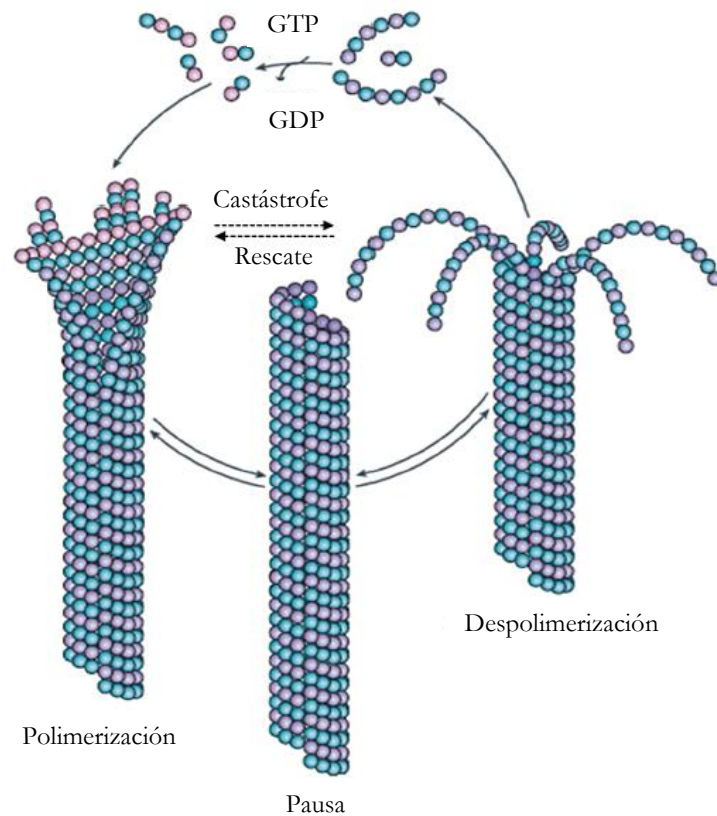


Figura 7. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La polimerización empieza con la incorporación de dímeros de tubulina. El cierre del extremo genera un microtúbulo en estadio intermedio que puede mantenerse en pausa, antes de someterse a un mayor crecimiento o pasar a la fase de despolimerización. El ciclo de polimerización-despolimerización se completa mediante el intercambio de GDP por GTP, en las subunidades desensambladas de los microtúbulos. Adaptación de (Akhmanova & Steinmetz, 2008).

Esta dinámica de los microtúbulos es de crucial importancia para llevar a cabo correctamente las distintas funciones celulares que se han comentado anteriormente, y muy especialmente en el proceso de formación del huso mitótico durante la mitosis, aumentando de 10 a 20 veces su dinámico, y siendo por tanto, unas estructuras clave en el ciclo celular (Jordan & Wilson, 1998).

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 8**). La G1 es la primera etapa del ciclo celular, y es la etapa donde tiene lugar la actividad propia de la célula como la secreción, conducción, endocitosis, etc. Además, en esta fase la célula duplica su tamaño debido a que duplica todos sus componentes así como la del ARN y proteínas. Las células en G1 pueden entrar en estado de quiescencia llamado G0 donde ni crecen ni proliferan (Vermeulen *et al*, 2003). 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 la energía necesaria. Por último, la tercera fase del ciclo celular es G2. En ella continúa la síntesis de proteínas y ARN. Esta fase

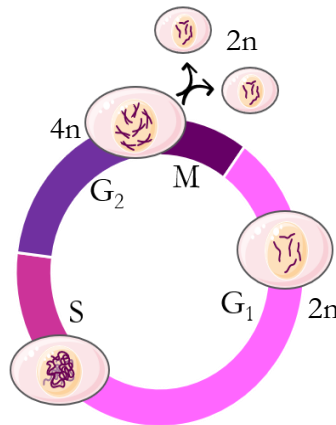


Figura 8. Etapas del ciclo celular. El ciclo celular está constituido por la interfase (G₁-S-G₂) y la mitosis o división celular (M).

termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. La mitosis se divide a su vez en profase, metafase, anafase y telofase (**figura 9**). En este punto, la dinámica de los microtúbulos aumenta de 10 a 20 veces con el fin de desmontar la red radial de microtúbulos de interfase y reorganizarse ensamblando el huso mitótico, aumentando su dinámica hasta 20 veces (Jordan & Wilson, 1998).

Las similitudes entre los microtúbulos y los CNTs se resumen en la **tabla 2**. Aunque ambas estructuras comparten muchas de las propiedades haciendo que interaccionen entre sí, hay una clara diferencia entre ellas. Mientras que los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas, los nanotubos de carbono son estables, lo que provoca cambios en los mecanismos celulares (Dong *et al*, 2015), cuando interactúan entre ellos, resultando en un efecto anti-proliferativo (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012), anti-migratorio (García-Hevia *et al*, 2015a) 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*, 2016c).

Tabla 2. Principales similitudes y diferencias entre los microtúbulos y los nanotubos de carbono

MICROTÚBULOS	NANOTUBOS DE CARBONO
Autoensamblaje	Autoensamblaje
Cilindros huecos	Cilindros huecos
Alta resiliencia	Alta resiliencia
24-25 nm diámetro	5-20 nm diámetro
Alta superficie/volumen	Alta superficie/volumen
DINÁMICO	ESTABLE

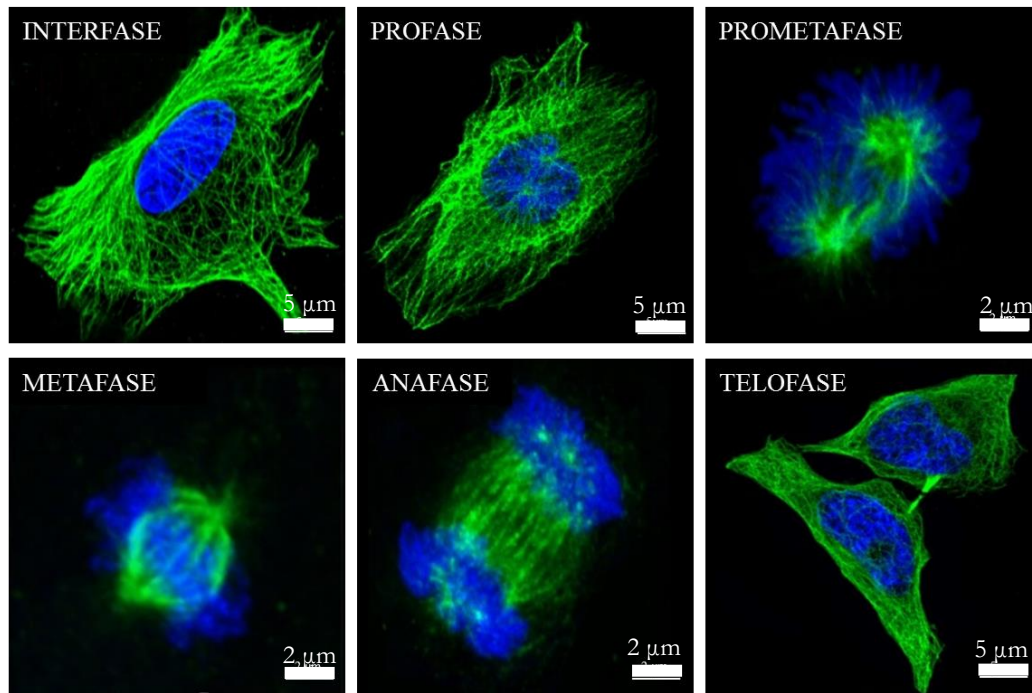


Figura 9. Imágenes de microscopía confocal del citoesqueleto microtubular (en verde) y del ADN (en azul) durante la división celular. En interfase, los microtúbulos se extienden a lo largo de todo el citoplasma celular. En prometáfase, las envueltas nucleares se han roto, los cromosomas están condensados y los microtúbulos, ensamblados en los centrosomas, recorren el citoplasma en busca de los cromosomas. En metafase, los cromosomas se encuentran en el ecuador de la célula formando la placa metafásica. En anafase, cada copia de cada cromosoma duplicado se separa moviéndose 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. Adaptación de (García-Hería, 2016).

3.4. NANOTERAPIA

Como hemos visto en el marco histórico de los sistemas de encapsulación, una de las aplicaciones más importantes de la nanotecnología consiste en usar nanomateriales como herramientas, diseñadas para que transporten una terapia hasta una zona dañada y, solamente cuando han reconocido esa zona, la liberen como respuesta a ciertos estímulos. Dicha liberación ha de ser a una velocidad apropiada y de manera controlada para que la terapia sea efectiva, lo cual se puede hacer mediante la variación de ciertas condiciones, como el pH o temperatura en la zona dañada, o mediante un control preciso de la velocidad de degradación del material encapsulante.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta aplicación sería aumentar la efectividad terapéutica y obtener tasas de toxicidad sistémica más bajas. Asimismo, se han desarrollado nanofármacos y nanodiagnósticos para aumentar los perfiles de biodisponibilidad, permitiendo la administración de dosis más bajas de fármaco y, por lo tanto, minimizando efectos adversos y

aumentando la calidad de la vida del paciente (Vizirianakis, 2011; Bregoli *et al*, 2016; Ehmann *et al*, 2013).

De esta manera nos podremos beneficiar de las mayores ventajas de la encapsulación de fármacos que podemos resumir en i) la liberación controlada y a demanda del fármaco, ii) su protección frente a la degradación (por ejemplo, enzimática) y por consiguiente, mayor estabilidad, iii) la administración dirigida y iv) la disminución de la toxicidad sistémica debida al fármaco (**figura 10**). Dependiendo del sistema vamos a poder encapsular todo tipo de terapias; desde fármacos solubles e insolubles en agua, moléculas pequeñas así como diferentes terapias génicas o proteicas. Además de los agentes terapéuticos, se pueden encapsular moléculas fluorescentes para que, como prueba de concepto, puedan observarse *in vivo* y monitorizar a tiempo real la administración y liberación de dicha terapia.

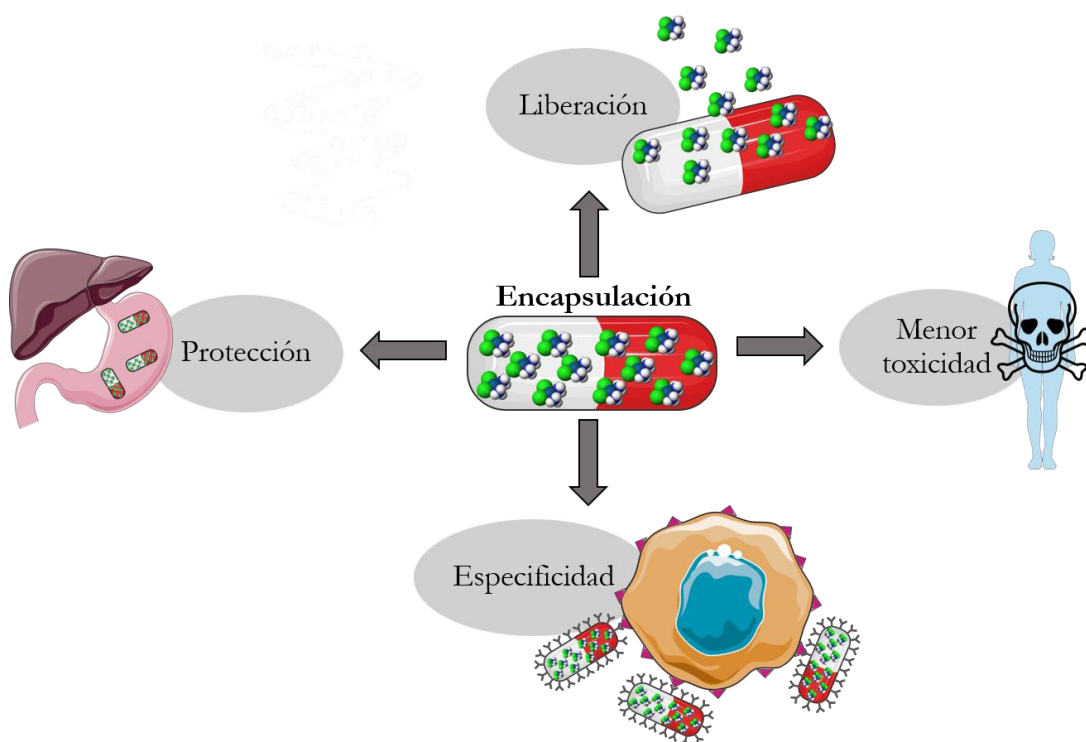


Figura 10. Diagrama representando las principales ventajas de la encapsulación de fármacos; liberación controlada, protección del fármaco frente a su degradación, transporte específico, menor toxicidad sistémica que el fármaco libre.

3.4.1 LIBERACIÓN CONTROLADA

Como ya hemos descrito, los fármacos administrados por vía oral se disuelven completamente en el momento que interaccionan con el medio acuoso del estómago. Por lo tanto, la encapsulación de fármacos proporciona una capa de protección para que la liberación

del contenido sea de forma gradual cuando el transportador se disuelva, solubilice, difunda o se erosione de forma natural (Singh & Jr, 2009).

Dependiendo del recubrimiento que se use se puede controlar la liberación del fármaco para evitar una rápida liberación de la terapia. Se están desarrollando mecanismos de liberación de fármacos mediante cambios en el ambiente que puedan ser controlados tanto por estímulos internos como externos. Así, se están estudiando desde recubrimientos que se activen mediante interruptores internos como cambios de pH, cambios en la temperatura o por cambios en la actividad enzimática; hasta con activadores externos como los ultrasonidos, campos magnéticos o a través de la luz.

La liberación controlada permite reducir las necesidades de administraciones recurrentes del medicamento, produciéndose una estimulación farmacológica constante y consecuentemente, un aumento de la eficacia del fármaco (Mustafa, 2015).

3.4.2 PROTECCIÓN DEL FÁRMACO

Además de la posible liberación controlada del fármaco, la encapsulación en nanosistemas, también lo protege de su rápido metabolismo u otras modificaciones químicas como la oxidación. Como ya hemos visto, a través de las diferentes vías de administración (Jain, 2008) los medicamentos están expuestos a su eliminación del organismo, degradación, inactivación y a los problemas de adsorción no específicos. La nanoterapia permite solucionar o mejorar la mayoría de estos problemas, modificando los recubrimientos utilizados.

3.4.3 ESPECIFICIDAD

Otra ventaja importante de la nanoterapia es la posible especificidad en su transporte. Para que haya una mejor acción del fármaco, éste debe ser entregado de la manera más específica posible a su célula. Anteriormente, los fármacos se dirigían de acuerdo con la afinidad de su sitio activo al sitio de enlace de dicha célula diana. Los resultados de la acción del fármaco a través de esta unión mostraban un éxito limitado y no específico, costoso y difícil (Mustafa, 2015). Por eso, mediante la nanoencapsulación del fármaco, además de mejorar su biodisponibilidad como se ha comentado anteriormente, se puede aumentar también su especificidad modificando la superficie del transportador mediante la unión de ligandos. El sistema nervioso, como se ha visto, sigue siendo una diana difícil de alcanzar, ya que la BHE es una de las barreras físicas más impermeables para la administración de fármacos (Brasnjevic *et al*, 2009). Por ello se ha visto que mediante la unión de diferentes proteínas como ligandos que se expresen en la superficie de las células endoteliales de los capilares cerebrales se puede dar un transporte más específico (Singh *et al*, 2017). Por ejemplo, se podrían usar dominios de unión específicos de neurotoxinas,

como la toxina botulínica, que se une a los receptores de las neuronas, y hace que el transportador se una a esos receptores, consiguiendo así un transporte específico a neuronas (Pavlik *et al*, 2016).

3.4.4 MENOR TOXICIDAD SISTÉMICA

Por último, pero no menos importante, otra ventaja que presenta la nanoencapsulación de fármacos es que puede producir menor toxicidad inespecífica que el fármaco libre. Gracias a la protección del fármaco y a su transporte más específico, es posible hacer que la alta toxicidad de algunos fármacos, como las quimioterapias por ejemplo, se vea disminuida, mejorando así, la calidad de vida del paciente.

Los problemas más comunes en el tratamiento del cáncer son por un lado, la alta toxicidad sistémica de los fármacos debido a la falta de direccionamiento, y por otro, la baja biodisponibilidad de los fármacos debido a su hidrofobicidad y agregación en un entorno fisiológico haciéndolos ineficaces (Haley & Frenkel, 2008). Existen ya ejemplos en la literatura donde se ha conseguido reducir la toxicidad sistémica de la doxorrubicina (DOX) (Feng *et al*, 2013; Elbially *et al*, 2015), 5-fluoracilo (Babaei *et al*, 2017), o docetaxel (Khosravian *et al*, 2016), entre otros, debido a su encapsulamiento.

4. NANOMATERIALES COMO SISTEMAS DE ENCAPSULAMIENTO

El uso de los nanomateriales como sistemas de encapsulación comenzó a lo largo de la segunda generación, en los años 90, y se ha ido desarrollando durante estos últimos 30 años. A lo largo de este apartado se analizarán las características así como sus ventajas y desventajas de los nanomateriales más usados, como liposomas, dendrímeros, nanogeles, nanotubos de carbono, partículas magnéticas, partículas de oro y partículas de sílice.

4.1. LIPOSOMAS

Los liposomas, descubiertos por Alec Bangham en 1960, son vesículas con forma esférica compuestas por lo general de fosfolípidos y esteroides de un tamaño de entre 50 hasta 450 nm (Bozzuto & Molinari, 2015). Son considerados unos buenos sistemas de transporte de fármacos por diversas razones: su estructura membranosa es análoga a las membranas celulares, facilitan la incorporación de fármacos en ellas, hacen que los compuestos terapéuticos sean estables, mejoran su biodistribución, se pueden encapsular tanto fármacos hidrófilos como hidrófobos y también son biocompatibles y biodegradables (Kumar Patra *et al*, 2018).

No obstante el uso de liposomas para fines de administración de fármacos está condicionado por el sistema reticuloendotelial, la opsonización y la inmunogenicidad. Una vez que los liposomas entran en el torrente sanguíneo, se encuentran con opsoninas, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad. Las opsoninas (inmunoglobulinas y fibronectina, entre otras) reconocen los antígenos de los liposomas, recubriéndolos. El sistema reticuloendotelial (como los macrófagos o las células dendríticas) posee receptores de opsoninas en su superficie, por lo que las opsoninas actúan como puente entre el liposoma y la célula fagocítica. Las opsoninas ayudan, así, al sistema reticuloendotelial a reconocer y eliminar los liposomas. Además, las lipoproteínas de alta y baja densidad interaccionan con los liposomas disminuyendo su estabilidad (Kumar Patra *et al*, 2018). Este nanomaterial, asimismo, tiende a acumularse en sitios como el hígado y el bazo, lo cual puede ser muy útil para transportar antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas del hígado, el bazo y la médula como la leishmaniasis (Kohno *et al*, 1998). Sin embargo, para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, utilizar este nanomaterial puede ser un inconveniente debido a que el paso por el hígado puede hacer que disminuya la biodisponibilidad del antineoplásico. Por eso, a lo largo de los últimos años se ha utilizado la PEGilación en los liposomas para aumentar la vida media de este nanomaterial en la circulación (Gauthier & Klok, 2010; Dimov *et al*, 2017). Sin embargo, estudios recientes han observado anticuerpos frente a ese polímero (Garay *et al*, 2012; Yang *et al*, 2016; Grenier *et al*, 2018), por lo que, aunque el PEG sigue siendo un polímero sintético bien tolerado, ahora se sabe que interactúa con el sistema inmunológico, por lo que tiene que tenerse en cuenta cuando se diseñan estructuras como sistemas de liberación de fármacos.

4.2. DENDRIMEROS

Los dendrímeros, desarrollados en los años 80 por primera vez, son macromoléculas sintéticas, altamente ramificadas, esféricas y monodispersas. Estos se agrupan en varios tipos según sus grupos funcionales: poli(amidoamina) (o PAMAM), poli(propileno imina) (PPI), glicodendrímeros y poli(amidoamina-organosilicio) (o PAMAMOS), entre otros, siendo el PAMAM, el más estudiado dada su solubilidad en agua y su posibilidad de atravesar el tejido epitelial (Noriega-Luna *et al*, 2014; Kumar Patra *et al*, 2018).

Gracias a los grupos funcionales periféricos que tienen, se pueden unir a su superficie fármacos o ligandos diana, entre otras moléculas, personalizándolos de forma fácil y controlada. Esto hace que estas estructuras sean excelentes candidatos como sistemas de transporte dirigido (Zhu & Shi, 2013; Kesharwani *et al*, 2015; Kumar Patra *et al*, 2018; Kesrevani & Sharma, 2016). Además, los dendrímeros pueden mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles, aumentar

la estabilidad de los fármacos activos dentro de su estructura y proporcionar también, cavidades internas dinámicas donde se pueden alojar tanto moléculas neutras como iones (Patidar & Thakur, 2011).

Sin embargo, el uso de dendrímeros en clínica está limitado debido a su toxicidad. La presencia de grupos amino en dichas estructuras (grupos positivos o catiónicos) resulta tóxica, ya que estos grupos causan desestabilización de la membrana celular induciendo lisis celular. Además, la propia naturaleza química del esqueleto dendrimérico ha resultado ser tóxica en diferentes estudios (Malik *et al*, 2000; Duncan & Izzo, 2005; Zhu & Shi, 2013).

4.3. NANOGELES

El término "nanogeles" generalmente define dispersiones acuosas de partículas de hidrogel formadas por redes de polímeros reticulados tanto física como químicamente de tamaño a nanoescala. Se introdujo por primera vez para el suministro de polinucleótidos (Kabanov & Vinogradov, 2009; Kesrevani & Sharma, 2016). Entre las ventajas más importantes de estos sistemas se pueden incluir: la simplicidad de la formulación, la alta capacidad de carga y la estabilidad del fármaco/terapia y el nanogel en la dispersión. Los nanogeles, además, tienen la capacidad de sufrir cambios de volumen rápido ya que pueden hincharse y colapsar ante diferentes estímulos como pH, fuerza iónica, y temperatura, entre otros. Esto hace que estas estructuras liberen de manera controlada compuestos biológicamente activos encapsulados, incluyendo fármacos cargados y biopolímeros. (Kabanov & Vinogradov, 2009). Además de la liberación controlada, se puede conseguir la administración dirigida de dicha terapia mediante la unión de diferentes ligandos diana a los nanogeles (Kabanov & Vinogradov, 2009; Kesrevani & Sharma, 2016). Estas estructuras asimismo son biocompatibles y biodegradables y pueden ser administradas tanto por vía oral como tópica, pulmonar, nasal etc (Hasegawa *et al*, 2009; Kabanov & Vinogradov, 2009; Seyfoori *et al*, 2016).

Dentro de las principales desventajas de los nanogeles podemos encontrar por un lado, su posible toxicidad debido a las trazas de disolventes, tensoactivos o productos de degradación de monómeros y polímeros sintéticos que no hayan sido eliminados durante su preparación (Sultana *et al*, 2013). Por otro lado, estas estructuras no suelen tener muchos dominios hidrofóbicos, lo que hace que la encapsulación de fármacos hidrofóbicos no ionizables sea costosa (Malmsten *et al*, 2010). Asimismo, el desarrollo de estos sistemas es muy costoso para un posible escalamiento a la industria farmacéutica.

4.4. PARTÍCULAS INORGÁNICAS

Las nanopartículas inorgánicas, entre las que podemos destacar partículas de oro, magnéticas y de sílice entre otras, aunque no han sido estudiadas tanto como las anteriormente descritas, tienen un gran potencial para aplicaciones biomédicas. Sin embargo, solo algunas de las nanopartículas han sido aceptadas para su uso clínico, mientras que la mayoría de ellas todavía se encuentran en la etapa de investigación.

4.4.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro constan de una parte central de átomos de oro que pueden ser funcionalizadas con una monocapa de grupos de tiol (Albulet *et al*, 2017). Las propiedades físicas, químicas y biológicas únicas que tienen estas nanopartículas son intrínsecas a su pequeño tamaño (de entre 1 a 150 nm). Una de sus propiedades más interesantes para la biomedicina es su capacidad fototérmica, es decir, al ser activadas con luz láser, desprenden calor, actuando así como auténticos “nanocalefactores”. Además dependiendo de su tamaño o forma, la longitud de onda (λ) puede variar desde el espectro ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo cercano (Han *et al*, 2006b; Albulet *et al*, 2017). Además de las propiedades fototérmicas, las nanopartículas de oro pueden ser producidas de tamaños y formas diversas de una manera relativamente sencilla (Brust *et al*, 1994; Grabar *et al*, 1995) y pueden ser funcionalizadas con diferentes moléculas como anticuerpos, fármacos, moléculas diana, etc. La funcionalización de las nanopartículas de oro se realiza normalmente mediante enlaces *tiol*, aunque también muestran afinidad por los grupos amino, fosfito y bisulfito (Shimmin *et al*, 2004). Estas partículas son, también, biocompatibles y tienen baja toxicidad (Connor *et al*, 2005) aunque, ésta depende de la carga superficial, forma y tamaño (Pan *et al*, 2007) de las partículas. Asimismo, las partículas con cargas positivas presentan más toxicidad debido a la lisis celular (Goodman *et al*, 2004).

Estas nanopartículas tienen diferentes aplicaciones que van desde ser utilizadas como terapia contra el cáncer gracias a su efecto hipertérmico, hasta la liberación controlada de un fármaco antitumoral asociado al efecto fototérmico (Huang *et al*, 2006, 2007), pasando por la terapia génica (Dunbar *et al*, 2018) debido a que mejoran la estabilidad del ADN frente a su degradación enzimática, química y física y aumentan la eficacia de transfección intracelular (Han *et al*, 2006a). Las nanopartículas de oro, por tanto, son una prometedora herramienta para el tratamiento y/o diagnóstico de diferentes enfermedades.

Otra de las aplicaciones de las nanopartículas de oro es en el diagnóstico, donde se podría diagnosticar diferentes enfermedades a través de pequeñas cantidades de muestras líquidas debido a la Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (SERS). La espectroscopia Raman

proporciona información sobre la vibración y rotación de las moléculas, dando así información de la huella digital de la estructura molecular o su entorno circundante.

Sin embargo, se necesitan más estudios de optimización del diseño de las nanopartículas como vectores multifacéticos para tratar enfermedades complejas como el cáncer. Asimismo, se necesitan estudios fundamentales que ayuden a comprender las interacciones moleculares de las nanopartículas con sus células diana, y su citotoxicidad, porque aunque se ha descrito que las nanopartículas de oro no son tóxicas, es importante diferenciar la toxicidad que pueda provocar el núcleo de la nanopartícula de las moléculas conjugadas (Arvizo *et al*, 2010).

4.4.2 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas magnéticas, comúnmente de hierro, níquel o cobalto, pueden ser manipuladas mediante un campo magnético. Tienen un tamaño de entre 5 a 500 nm. Las propiedades fisicoquímicas varían dependiendo de la síntesis y el tamaño, siendo superparamagnéticas las menores de 150 nm en el caso de las de hierro, por ejemplo (Lu *et al*, 2007). Así, se impide la auto aglomeración de las partículas ya que, éstas sólo presentan un comportamiento magnético cuando se aplica un campo magnético externo. Dentro de las partículas magnéticas las más estudiadas son las ferritas. Una de las grandes ventajas de estas nanopartículas es la posibilidad de hacer hipertermia magnética. Estas nanopartículas son capaces de generar calor cuando son estimuladas por un campo magnético. Así, se puede aumentar la temperatura de las células tumorales, destruyéndolas, y logrando, en consecuencia, la regresión del tumor. Existen dos mecanismos por los cuales la hipertermia puede matar el tejido tumoral. Por un lado, se puede inducir un aumento moderado de la temperatura, de entre 41 y 46 ° C (Moroz *et al*, 2002; Kumar & Mohammad, 2011; Ferreira *et al*, 2017) durante unas pocas horas, lo que produce estrés térmico, afectando las funciones celulares, y generando así, daño celular y apoptosis (Asín *et al*, 2012). Por otro lado, se puede aumentar la temperatura por encima de 46 ° C, lo que provoca termoablación; necrosis y coagulación de los tejidos en unos pocos minutos (Asín *et al*, 2012; Kumar & Mohammad, 2011; Ferreira *et al*, 2017). Estas nanopartículas superparamagnéticas, además, son capaces de llegar a los tumores sólidos debido al efecto EPR, y también pueden ser transportadas activamente con la unión de ligandos a su superficie (Kudr *et al*, 2017). Asimismo, los transportadores magnéticos podrían ser focalizados magnéticamente (mediante un imán). Para esta aplicación es muy importante conocer el tamaño, la carga y la química de la superficie de las partículas, ya que estas propiedades influyen en el tiempo de circulación sanguínea y la biodisponibilidad, siendo las nanopartículas de 10 a 100 nm las que mayor vida media en circulación tienen (Kumar Gupta & Gupta, 2005). Las

nanopartículas de óxido de hierro pueden utilizarse para diagnóstico y detección, como agentes de contraste en Imagen de Resonancia Magnética Nuclear (MRI) debido a las propiedades superparamagnéticas ya mencionadas, las cuales permiten acortar los tiempos de relajación longitudinal y transversal (T1 y T2) de los protones del agua que están a su alrededor al aplicarles un campo magnético estático y uniforme (Rodríguez, 2014).

Sin embargo, estas nanopartículas tienen limitaciones en su uso clínico debido principalmente a su toxicidad y la posibilidad de inducir la embolización de los vasos capilares por la formación de aglomerados (Laurent *et al*, 2011; Liu *et al*, 2013a; Vangijzegem *et al*, 2019).

4.4.3 PARTÍCULAS DE SÍLICE

Las partículas de óxido de silicio (SiO_2) han ido aumentando el interés en el campo de la bioimagen, diagnóstico, administración controlada de terapias y fototerapia (Kumar *et al*, 2008; Vallet-Regí *et al*, 2018; Ohulchanskyy *et al*, 2007), entre otras, en el mundo de la nanomedicina. Una de las grandes ventajas de este nanomaterial es que su síntesis se puede variar generando así nanopartículas con de diferentes tamaños, formas y propiedades de superficie definidos (Lin *et al*, 2006; Hao *et al*, 2016). Además, esta superficie fácilmente modificable es esencial para una biocompatibilidad y biodistribución óptimas (Mattos & Foster, 2011; Tang *et al*, 2012). La síntesis de nanopartículas de sílice tiene una historia que abarca más de 60 años. Las nanopartículas de sílice amorfa monodispersas se sintetizaron primero por Kolbe en 1956 (Doktoringenieur *et al*, 1956) y más tarde, fueron mejoradas por Stöber y Fink en 1968 (Stober & Fink, 1968). Mediante este nuevo método se consiguió ajustar el tamaño de las nanopartículas desde pocos nanómetros a varias micras de diámetro cambiando la proporción de catalizador y precursor. A principios de los años 90, se sintetizaron por primera vez las partículas de sílice mesoporosa (Yanagisawa *et al*, 1990; Beck *et al*, 1992; Kresge *et al*, 1992). Así, se han conseguido sintetizar diferentes tipos de partículas de sílice como esferas sólidas (Doktoringenieur *et al*, 1956; Stober & Fink, 1968), partículas mesoporosas (Yanagisawa *et al*, 1990; Kresge *et al*, 1992; Wan & Zhao, 2007), esferas mesoporosas huecas (Zhang *et al*, 2008; Chen *et al*, 2014a), nanotubos de sílice (Fan *et al*, 2003), etc., entre otros. Dentro de las partículas de sílice, las partículas de sílice mesoporosa (MSP; del inglés *mesoporous silica particles*) han sido de las más estudiadas debido a características (Maleki & Hamidi, 2016) que se detallan a continuación.

4.4.3.1. Características fisicoquímicas

Estas partículas presentan una estructura interna de mesoporos bien definida (de 2 a 10 nm) con un gran volumen de poro ($0.2\text{-}1\text{ cm}^3/\text{g}$) y una elevada área superficial que puede oscilar entre $700\text{-}1000\text{ m}^2/\text{g}$. Mediante la modificación de la síntesis se pueden conseguir tamaños de

partícula en un rango entre 50-600 nm (He *et al*, 2009). Estas características abren la posibilidad de encapsular grandes cantidades de terapias tales como docetaxel (Khosravian *et al*, 2016), paclitaxol (Meng *et al*, 2015) o doxorubicina (Rosenholm *et al*, 2011), entre muchas otras. Además, cabe la posibilidad de funcionalizar específicamente tanto el sistema de poros internos, como la superficie de la partícula, para diferentes fines como el transporte activo o la bioimagen, entre otros. Estas excelentes propiedades superficiales y su porosidad pueden ser también, una gran herramienta en su aplicación en la medicina regenerativa ósea (Maleki & Hamidi, 2016).

4.4.3.2. Biocompatibilidad

Además, las MSP son muy biocompatibles. Diferentes estudios en los que estas partículas se han administrado a varios tipos celulares y a ratones demostraron que no producen citotoxicidad (Agostini *et al*, 2012; Chen *et al*, 2013; Slowing *et al*, 2008; Huang *et al*, 2011; Lu *et al*, 2010). Además, hay trabajos que muestran que son degradables en diferentes medios como en agua y en medios salinos (Vallet-Regí *et al*, 2018; Maleki & Hamidi, 2016) y en algunos cultivos celulares (Zhai *et al*, 2012; Shi *et al*, 2017). La morfología, el tamaño y la funcionalización (Hao *et al*, 2016; Paris *et al*, 2015; Cauda *et al*, 2010) de las partículas son factores a tener en cuenta cuando se habla tanto de internalización como de degradación de las partículas. De esta forma, por ejemplo las partículas con forma esférica son captadas por las células más rápidamente (Maleki & Hamidi, 2016) y además, son más biodegradables que las que presentan formas más tubulares (Hao *et al*, 2012).

4.4.3.3. Sistemas de liberación controlada

Una de las principales ventajas de estas partículas es la posibilidad de diseñar sistemas donde los fármacos/terapias entren en los poros mediante mecanismos de difusión y una vez dentro producir el bloqueo de una liberación prematura mediante el recubrimiento con diversas estructuras (llamadas en inglés *gatekeepers*). Posteriormente, se podrían emplear diferentes estímulos para llevar a cabo la liberación controlada del fármaco (Maleki & Hamidi, 2016; Vallet-Regí *et al*, 2018). Estos *gatekeepers* pueden responder a diferentes estímulos (ver **figura 11**).

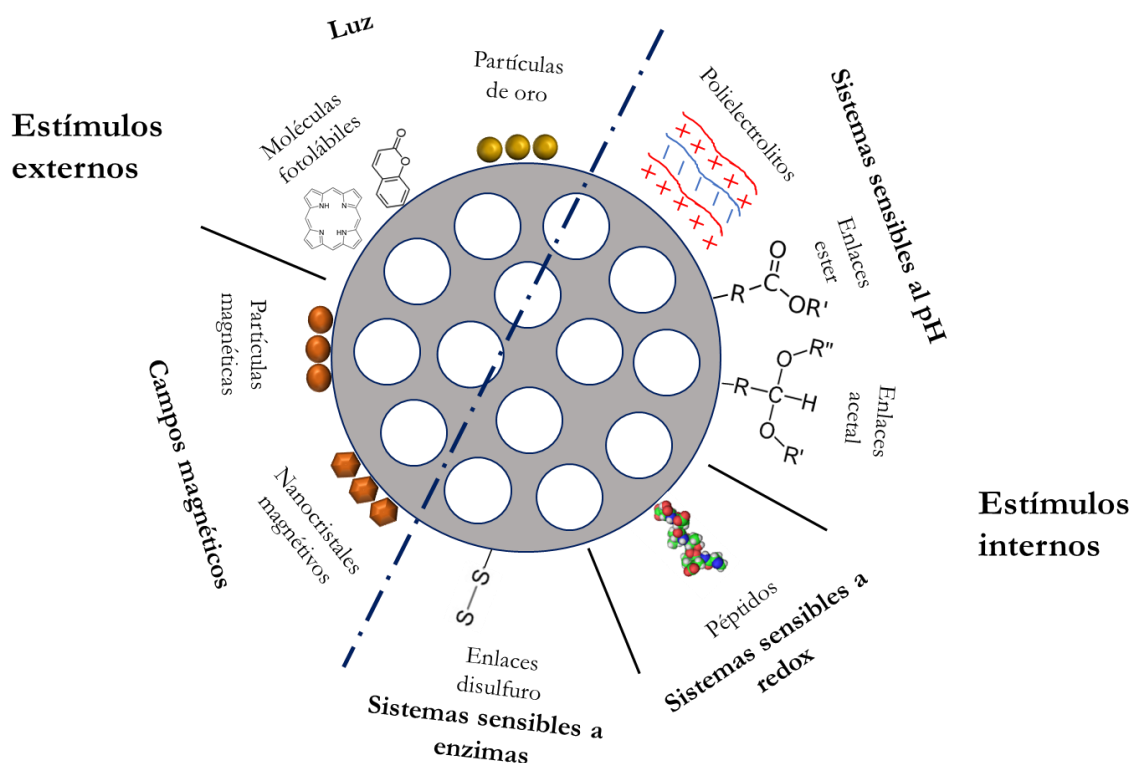


Figura 11. Diagrama resumen de los principales estímulos que hay para mediar la liberación de la terapia desde los poros de las partículas de sílice mesoporosa

- Estímulos internos para la liberación controlada

Se pueden utilizar estructuras como polímeros que se modifiquen/degraden ante un cambio de pH (Zhang *et al*, 2017; Gisbert-Garzarán *et al*, 2017) como ocurre, por ejemplo, en el entorno tumoral donde aumenta la acidez del medio debido a la actividad metabólica de las células tumorales (Warburg, 1956). Además, se pueden utilizar *linkers* que se rompan en ambientes ácidos como en endolisosomas para que ocurra la liberación tras esa incisión. Así, se pueden usar enlaces de tipo acetal (Chen *et al*, 2014b, 2015b; Martínez-Carmona *et al*, 2018), éster (Sun *et al*, 2014; Tan *et al*, 2015), hidracina (Chem *et al*, 2011; Huang *et al*, 2011; Lin *et al*, 2012), entre otros. Algunos *gatekeepers* se pueden degradar en un ambiente con una actividad enzimática aumentada como puede ser en el microambiente tumoral, donde hay una sobreexpresión de enzimas tipo proteasas (Cheng *et al*, 2015; Liu *et al*, 2015).

Por último, existen enlaces, como los enlaces disulfuro, que son susceptibles a la acción de agentes reductores. Así, se pueden utilizar enlaces sensibles a reacciones Redox y hacer que se desencadene una liberación controlada tanto en el sistema endolisosomal como en células tumorales, debido a la gran cantidad de glutatión (agente reductor) que presentan (Liu & Qi, 2015; Zhang *et al*, 2014).

- Estímulos externos para la liberación controlada

Se pueden hacer estructuras más complejas recubriendo las partículas de sílice mesoporosa de partículas magnéticas o de oro. Estas a su vez se podrían recubrir, por ejemplo, con *gatekeepers* sensibles a cambios de temperatura. De esta manera, las partículas magnéticas, mediante el uso de un campo magnético (Baeza *et al*, 2012), pueden generar calor. Este cambio en la temperatura haría que el recubrimiento de las partículas se degradase, provocando una liberación controlada de la terapia encapsulada (Guisasola *et al*, 2015; Baeza *et al*, 2012).

Mediante el uso de nanopartículas de oro se podría usar la luz como estímulo externo (Babaei *et al*, 2017). La luz es un estímulo rápido, no invasivo, limpio y eficiente que puede controlar la administración de medicamentos con una alta resolución espacial y temporal (Ferris *et al*, 2009; Wu & Butt, 2016). Aunque la mayoría de las fotorreacciones utilizadas en la administración de fármacos han sido inducidas por la luz UV, la longitud de onda más potente (Inoue *et al*, 2007; Ferris *et al*, 2009; Wang *et al*, 2014), las mejores longitudes de onda para una buena penetración en el tejido son aquellas entre 800 y 1100 nm, que corresponden a la llamada "ventana biológica" (Mekaru & Tamanoi, 2015). De esta manera, la luz activaría las partículas de oro, y estas generarían calor. Este cambio en la temperatura podría hacer que el recubrimiento se modifique/degrade posibilitando así la liberación a demanda del fármaco.

Si bien se ha visto que las MSP tienen grandes ventajas para su uso como transportadores de fármacos, también tienen inconvenientes a la hora de trasladarlas a la clínica. Para ello, hay puntos que deben ser cuidadosamente estudiados como: la fabricación escalable y reproducible a gran escala, el control espacial y temporal de la liberación del fármaco, el transporte activo de las partículas hacia un tejido concreto, el tiempo prolongado de circulación de la sangre y una comprensión detallada de la biocompatibilidad y la toxicidad potencial (Maleki & Hamidi, 2016).

Pese a las desventajas que puedan tener estas partículas, su multifuncionalidad, además de las propiedades que se han mencionado antes, hacen que puedan ser unas buenas candidatas como sistemas de transporte. Vistas estas propiedades, durante este trabajo se van a usar tanto partículas de sílice amorfa como mesoporosa.

4.5. NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono descritos por primera vez en 1991 (Iijima, 1991) son láminas de grafeno enrolladas sobre si mismas en forma de tubo, pudiendo tener una o más de una capa de grafeno. Así se pueden diferenciar nanotubos de carbono de una capa (SWCNT; del inglés *single*

walled carbon nanotube), de dos capas (DWCNT; del inglés *double walled carbon nanotube*) o nanotubos de carbono multi-pared (MWCNT; del inglés *multi walled carbon nanotube*) (ver **figura 12**).

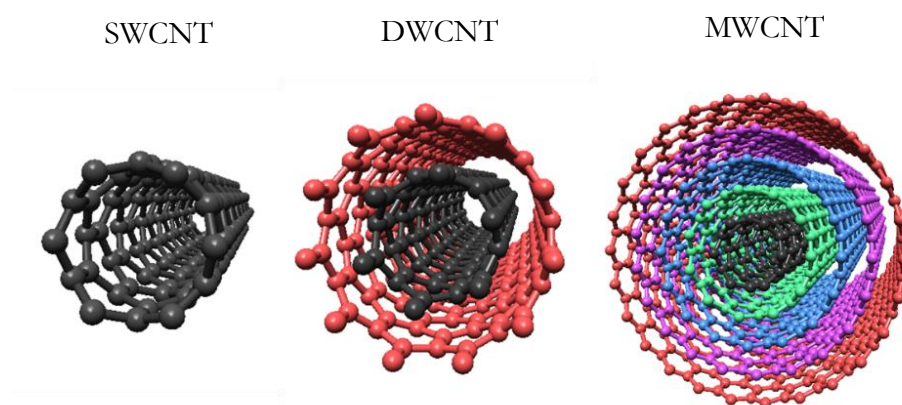


Figura 12. Tipos de nanotubos de carbono en función del número de capas de grafeno que lo forman. A la izquierda nanotubo de una sola capa (SWCNT), en el centro de dos (DWCNT) y a la derecha nanotubos de más de dos capas (MWCNT).

Su composición y estructura hace que presenten excepcionales propiedades físicoquímicas a nivel térmico, mecánico, electrónico o de reactividad superficial. Asimismo, este material es una de las fibras más resistentes conocidas hoy en día, de hecho, se encuentra entre los materiales más elásticos 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. También 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). Debido a todas estas propiedades sus aplicaciones en los campos de los supercondensadores (Portet *et al*, 2007), la nanoelectrónica (Jang *et al*, 2007) o en la fabricación de placas solares (Jia *et al*, 2008) por ejemplo, es muy grande.

Aunque sus aplicaciones sean extensas, para hablar de aplicaciones en el campo de la medicina, es necesario hablar de su funcionalización, ya que es muy difícil resuspenderlos de forma nanométrica en medios biológicos. La funcionalización de los nanotubos de carbono, por lo tanto, consiste en su recubrimiento con determinadas moléculas o con la modificación química de su superficie. Este proceso 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.

Como ya he comentado anteriormente, a lo largo de los últimos años en nuestro laboratorio se han estudiado las propiedades antitumorales intrínsecas de los nanotubos de carbono. Así se ha demostrado que los MWCNT's son capaces de interaccionar con la dinámica microtubular, inhibiéndola, dando como resultado un bloqueo en la división celular y una mala segregación cromosómica, que finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012). El tratamiento con MWCNT's produce un amplio espectro de aberraciones que ocurren en todas las etapas mitóticas, observándose husos mitóticos y distribuciones cromosómicas aberrantes (ver **figura 13**), 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 y también en tumores de melanoma sólidos en modelos murinos (García-Hevia *et al*, 2016c; González-Lavado *et al*, 2018).

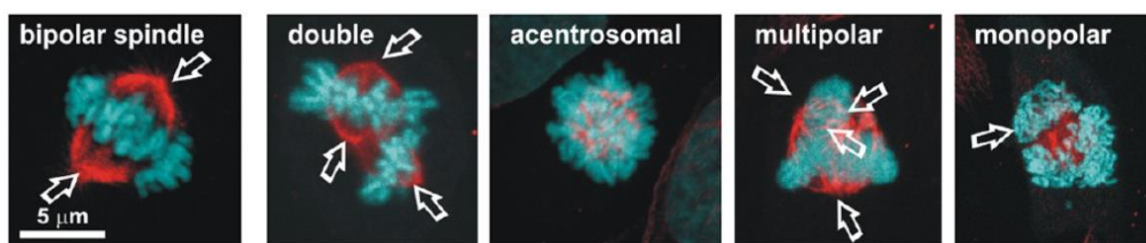


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de husos mitóticos de células HeLa tras 70 h de la exposición a MWCNTs, señalando en azul el ADN y en rojo los microtúbulos. Se observan husos mitóticos aberrantes incluyendo husos dobles, microtúbulos acentrosomales desorganizados, husos multipolares y finalmente monoastrales (de izquierda a derecha). Las flechas blancas señalan centrosomas. Adaptación de (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012)

Además de sus aplicaciones en el campo del cáncer, también hemos estudiado este nanomaterial como posible sistema de transporte de fármacos (González-lavado *et al*, 2019). Los fármacos pueden unirse a la superficie, ya que presentan una gran capacidad de funcionalización y una superficie muy reactiva. La unión de fármacos a su superficie se puede dar mediante interacciones no covalentes (tipo Van der Waals, π - π o electrostáticas) (González-lavado *et al*, 2019) o mediante enlaces covalentes (mediante la modificación de su superficie, añadiendo grupos funcionales a las paredes laterales de los nanotubos) (Bhatt *et al*, 2016). Otra característica importante que hace que este nanomaterial pueda ser utilizados como sistema de transporte, es que puede atravesar muy fácilmente muchas barreras biológicas. Pueden ser internalizados a las células mediante diferentes procesos como i) la endocitosis mediada por receptor, al funcionalizarlos con proteínas (Zhao *et al*, 2011; Lacerda *et al*, 2012; Maruyama *et al*, 2015; Caoduro *et al*, 2017), ii) la difusión, iii) la fusión de la membrana o iv) el transporte directo de poros del material extracelular a la célula, lo que implica la transmisión directa de los nanotubos de carbono mediante el mecanismo de "nanoneedle" (es decir, la translocación directa al

citoplasma a través de la membrana plasmática) (Al-Jamal *et al*, 2011; Kostarelos *et al*, 2007). Así, los nanotubos de carbono permiten transportar fármacos a través de membranas biológicas al citoplasma debido a i) que presentan forma de fibra con un tamaño dentro de la escala nanométrica, ii) que en el caso de que estén funcionalizados químicamente, presentan un carácter anfipático (hidrofóbico-hidrofílico), y iii) debido a sus dimensiones tanto longitudinales como laterales (Serpell *et al*, 2016). En resumen, se puede decir que la capacidad de los nanotubos de carbono para atravesar el umbral entre una célula viva y su entorno circundante es única: ningún otro método parece mostrar la misma eficacia, lo que abre las puertas a muchas posibles aplicaciones terapéuticas.

No obstante, aunque las posibilidades de los nanotubos de carbono son amplias existen diferentes inconvenientes que se deben mejorar antes de su aplicación a la clínica. Así, se ha observado que pueden tener efectos a largo plazo como; acumulación en tejidos, daño tisular, provocar reacciones inflamatorias, citotóxicas, roturas de ADN, segregación cromosómica asimétrica, aneuploidías, etc. (Madani *et al*, 2013; Rittinghausen *et al*, 2014; Kostarelos, 2008; Caoduro *et al*, 2017; Bhattacharya *et al*, 2016). Por ello, una de las posibles mejoras podría ser la biodegradación de estos nanomateriales (Russier *et al*, 2017; Kagan *et al*, 2010). En nuestro laboratorio hemos estudiado la degradación de los MWCNTs tanto en cultivos celulares de macrófagos como en tumores sólidos de melanoma, y hemos observado cómo los MWCNTs sometidos a tratamientos mediante reacciones de oxidación son degradados en ambos casos. Hemos conseguido por tanto, disminuir la posible toxicidad de un nanomaterial altamente tóxico sin perder sus propiedades antitumorales intrínsecas (González-Lavado *et al*, 2018).

Otro inconveniente importante a destacar de los nanotubos de carbono es que, al unir un fármaco o terapia al nanotubo de forma no covalente, ésta, puede intercambiarse con el medio y producir una liberación temprana. Por otro lado, la funcionalización covalente no siempre es posible puesto que hay fármacos sensibles a las condiciones de la reacción y pueden ser degradados al unirse a los nanotubos. Además, no todos los fármacos tienen los grupos funcionales idóneos para que las reacciones con la superficie del nanotubo tengan lugar (González-Lavado, 2018).

5. PROPIEDADES IDEALES DE LOS NANOSISTEMAS TERAPÉUTICOS

Tras analizar las ventajas y desventajas (resumidas en la **tabla 3**) de diferentes nanomateriales utilizados como agentes de transporte, se puede decir que un sistema de transporte y liberación de fármacos ideal tendría que tener las propiedades que se resumen a continuación (Jain, 2008):

- Tamaño y forma del material adaptable.
- Síntesis reproducible y fácil de escalar a nivel industrial.
- Gran capacidad de carga y encapsulación de la terapia.
- Protección de la terapia frente a la inactivación de su transporte.
- Capacidad de funcionalizar su superficie para un posible transporte dirigido.
- Que dicha funcionalización sea estable, que haya el mínimo intercambio posible entre las proteínas sanguíneas y los ligandos de reconocimiento para que la unión inespecífica sea la mínima.
- Adhesión celular, endocitosis y tráfico intracelular adecuados para permitir la administración terapéutica en el lugar de acción.
- Liberación controlada del fármaco y/o a demanda.
- Biocompatibilidad del sistema, así como baja toxicidad
- No generar inmunogenicidad
- Bioeliminación y/o biodegradación.

Tabla 3. Resumen de las diferentes ventajas y desventajas de los nanomateriales utilizados como sistemas de transporte de fármacos.

Nanomateriales		Ventajas	Desventajas
Liposomas		Estabilidad de fármacos y buena encapsulación (hidrófilos e hidrófobos), mejoran biodistribución, biocompatibles y biodegradables	Reconocidos por el sistema reticuloendotelial, opsonización y inmunogenicidad
Dendrimeros		Superficie modificable, mejor solubilidad y estabilidad de fármacos, cavidad interior	Toxicidad: grupos amino y propia estructura
Nanogeles		Formulación simple, alta capacidad de carga y la estabilidad del fármaco, liberación controlada, superficie modificable, diferentes vías de administración, biodegradables/biocompatibles	Toxicidad, encapsulación de fármacos hidrofóbicos difícil
NP oro		Fototerapia, síntesis variable, funcionalización con grupos -tiol, biocompatibles, baja toxicidad	Falta de estudios, posible toxicidad del núcleo
NP magnéticas		Hipertermia, Imagen de Resonancia Magnética Nuclear	Toxicidad, inmunogenicidad
NP de sílice		Síntesis, propiedades físico-químicas, biocompatibles, liberación controlada (<i>gatekeepers</i>)	Fabricación escalable y reproducible a gran escala, toxicidad
CNT		Propiedades antitumorales y antimigratorias, encapsulamiento o unión de fármacos, capacidad de atravesar membranas	Toxicidad, funcionalización no covalente

Debido a que no hay ningún nanomaterial que presente todas estas características mencionadas, nuestro laboratorio propone el uso de un **sistema multiestructurado** basado en diferentes nanomateriales como una posible solución a dicha problemática. Esta tesis doctoral propone el diseño y estudio de un sistema terapéutico versátil, biocompatible y biodegradable que consistirá en una partícula de sílice como núcleo, recubierta de nanotubos de carbono, todo ello funcionalizado con proteínas.

II. Objetivos

“Lo más revolucionario que una persona puede hacer es decir siempre en voz alta lo que realmente está ocurriendo”

Rosa Luxemburgo

1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general que persigue esta tesis doctoral es llevar a cabo el diseño y la evaluación de un sistema multiestructurado biodegradable de nanoencapsulación. Para lograr este objetivo se va a utilizar un nanosistema formado por sílice y nanotubos de carbono oxidados biodegradables.

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 nuevo sistema de nanoencapsulación de terapias biodegradable basado en partículas de sílice y nanotubos de carbono.
2. Estudio de la interacción de los sistemas de nanoencapsulado con la superficie celular
3. Estudio del destino intracelular de los sistemas
4. Evaluación de la posible nanotoxicidad de los sistemas diseñados
5. Estudio del procesamiento y degradación de los sistemas de nanoencapsulación *in vitro* y en cultivos celulares.
6. Estudio de la liberación de un colorante nanoencapsulado como prueba de concepto en medios fisiológicos

III. Materiales y Métodos

“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de forma errónea es mejor que no pensar.”

Hypatia

1. NANOMATERIALES

Durante este proyecto de tesis se ha trabajado tanto con nanotubos de carbono multi-pared oxidados y partículas de sílice (sólida y mesoporosa) como con un sistema multiestructurado formado por ambos nanomateriales.

1.1 NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED

Se utilizaron nanotubos de carbono multipared prístinos (p-MWCNT) (**figura 14**) de diferentes marcas comerciales; Nanocyl (Ref NC3100TM) y Sigma-Aldrich (Ref 698849). En la **tabla 4** se detallan las características principales de ambos.

Tabla 4. Principales características físicas de los p-MWCNTs utilizados

Características	Nanocyl (Ref. NC3100TM)	Sigma Alrich (Ref. 698849)
Pureza	>95 %	> 98 %
Diámetro externo medio (nm)	9.5	8.7-10
Longitud media (μm)	1.5	10

Para obtener nanotubos de carbono oxidados, se oxidaron los p-MWCNT de nanocyl mediante dos procesos diferentes.

I. Los nanotubos de carbono se pretrataron con acetona y etanol para eliminar los restos orgánicos. Después, se oxidaron (100 mg de MWCNT) en una mezcla sulfonítrica H₂SO₄ (98 %)/HNO₃ (65 %) en relación de volúmenes (v/v = 3/1) durante primero 15 minutos con una sonda ultrasónica (20 W, 100 % potencia, pulsos de 1 segundo ON/OFF) y después en un baño de ultrasonido durante 4 horas. La muestra se lavó con una solución acuosa de NaOH mediante tres ciclos de ultracentrifugación/redispersión (31164 g, 4 h). Cuando el pH se estabilizó en 10, la muestra se sonicó en punta durante 2 h. Una vez sonicados, los MWCNT se lavaron con agua mediante tres ciclos de ultracentrifugación/redispersión (31164 g, 8 h). Finalmente, se obtuvo una dispersión estable de MWCNT oxidados (o-MWCNTs) con una carga superficial negativa.

II. Para el segundo método, primero, los 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 H_2SO_4 (98 %)/ HNO_3 (65 %) (2.5 mg de p-MWCNTs por cada mililitro de mezcla sulfonítrica) en relación de volúmenes ($v/v = 3/1$). Estos nanotubos dispersos se pusieron a 37 °C en agitación magnética continua durante 9 horas para conseguir un grado de oxidación notable. Finalmente, la disolución ácida sobrante se eliminó mediante filtración utilizando un tamaño de poro de 0.45 μm (Ref. MPV045047N). Los MWCNTs oxidados (o-MWCNT) se lavaron repetidas veces con dd H_2O hasta conseguir un pH neutro.

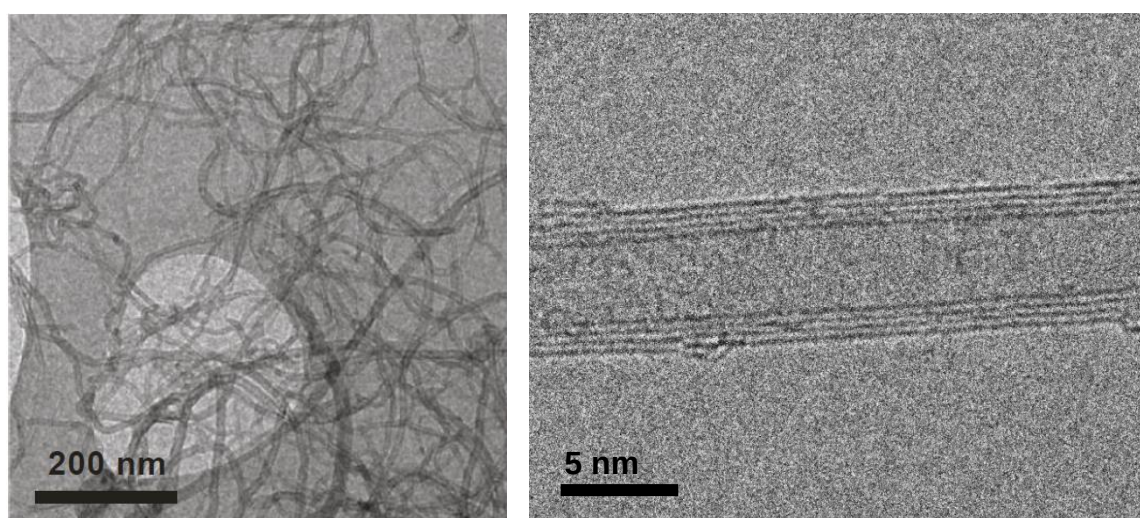


Figura 14. Imagen TEM de un conjunto de MWCNTs prístinos a la izquierda. A la derecha un único nanotubo de 3 paredes, con un diámetro exterior de aproximadamente 5 nm, e interior de aproximadamente 2.5 nm. Imágenes obtenidas con el equipo JEOL HEM 2100 (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012).

1.2 PARTÍCULAS DE SILICE

Se han estudiado dos tipos de partículas de sílice diferentes; partículas de sílice sólida y sílice mesoporosa. Estas partículas se han sintetizado en el laboratorio del Dr Miguel A. Correa Duarte en la universidad de Vigo.

1.2.1 REACTIVOS

- 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 = 70 000 Da, Sigma Aldrich, Ref: 243051)

- Hidróxido sódico (NaOH, $\geq 97\%$, Sigma Aldrich)
- Tetraetilortosilicato (TEOS, 98% , Sigma Aldrich, Ref. 131903)
- Etanol (EtOH)
- Hidróxido de amonio (NH_4OH , $28\text{-}30\%$ NH_3 , Fluka)
- Cloruro sódico (NaCl , $\geq 99\%$, Merk Millipore, Ref. 106404)
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $99+\%$, ACROS, Ref. 227165000).

1.2.2 PARTÍCULAS DE SÍLICE AMORFA (SiO_2)

Las partículas de sílice amorfa ($\sim 500\text{ nm}$) se prepararon utilizando el método de Stöber modificado en el laboratorio de Miguel A. Correa Duarte. Para ello, se añade una solución de TEOS (1.7 mL, 98%) a una solución que contiene hidróxido de amonio (1.97 mL), agua (3.1 mL) y etanol (18.2 mL). Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El exceso de reactivos se elimina mediante tres ciclos de centrifugación/redispersión con etanol (9500 g , 10 min). Una vez lavadas, las partículas se vuelven a dispersar en 25 ml de agua. Para poder trazar las partículas en las células se les une un colorante. Para ello, primero se funcionalizan con APS

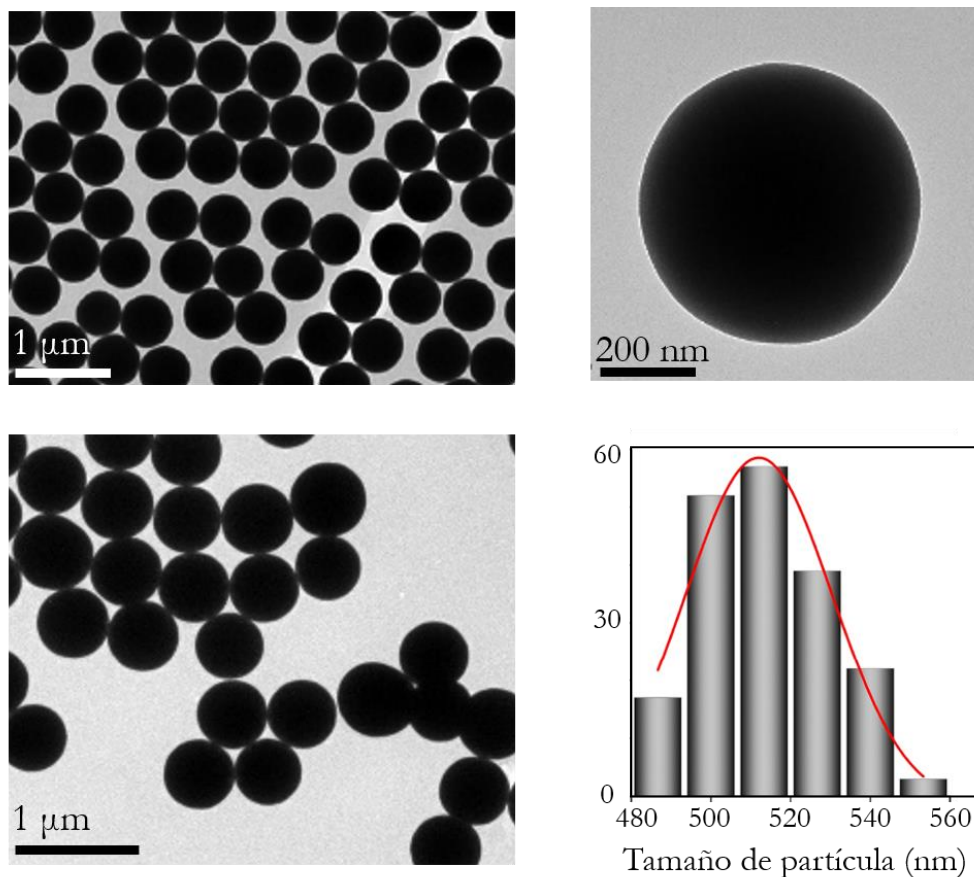


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las partículas a diferentes escalas, y un histograma de la distribución de tamaños.

mediante la adición de 0.25 ml de APS en una dispersión etanólica de SiO₂ (8.7 mg/mL), y después se ligan con diferentes colorantes, como el isotiocianato de rodamina B (RBITC) y el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (**figura 15**).

Estas partículas, además, se recubrieron con nanotubos de carbono oxidados como se ha descrito en el apartado anterior. Las partículas de SiO₂, con una carga superficial negativa al igual que los o-MWCNTs, se funcionalizaron con diferentes polielectrolitos mediante la técnica de “*layer-by-layer*” (Sukhorukov *et al*, 1998), con el fin de lograr una carga positiva (PDDA-PSS-PDDA), antes del recubrimiento con nanotubos de carbono (ver **figura 16**). Para ello, 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 durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. El exceso de PDDA se elimina con tres ciclos de centrifugación/redispersión en agua. A continuación, se funcionalizaron con una segunda capa del polielectrolito negativo PSS. Así, el pellet de partículas 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 otros 30 min. El exceso de PSS se eliminó siguiendo el mismo procedimiento que en el caso del PDDA. Por último, se recubrió con una tercera capa de PDDA siguiendo el mismo procedimiento de antes. Así se obtuvieron partículas SiO₂ con carga positiva, por lo que ahora sí se podrán funcionalizar mediante uniones de tipo electrostático con los o-MWCNT con carga negativa (ver **figura 16**). El exceso de nanotubos de carbono se eliminó mediante ciclos de centrifugación/redispersión en agua (a 3300 g, durante 20 minutos).

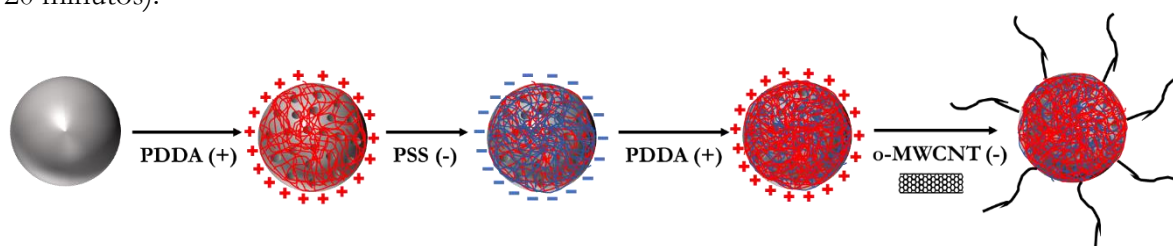


Figura 16. Esquema del mecanismo de sellado de las partículas de sílice por el método “*layer-by-layer*” y posterior recubrimiento con o-MWCNTs.

Las partículas de sílice amorfa se utilizaron para los estudios de internacionalización en células y ver el comportamiento de éstas, así como para hacer una primera prueba de liberación.

1.2.3 PARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS

La síntesis de las partículas de sílice mesoporosa se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (He *et al*, 2009) en el laboratorio de Miguel A. Correa Duarte en la Universidad de Vigo. Primero se pesaron 0.8575 g de K_2HPO_4 y se introdujeron en un matraz de tres bocas (de 250 mL). Después, se pesaron 0.145 g NaOH y se disolvieron en 10 mL de H_2O . Una vez añadido el NaOH al matraz, se añadió H_2O hasta un volumen final de 100 mL. Se añadieron también 15 mL de glicerol y se calentó el sistema a reflujo hasta 95 °C, bajo agitación magnética (con una barra agitadora). Cuando la temperatura de éste estuvo estabilizada (a 95 °C) se disolvieron 0.4556 g de CTAB en 10 mL H_2O (aplicar calor para conseguir su disolución), y se introdujeron en el matraz. Se añadieron 250 μ L de TEOS cada 30 min a través del septum con una jeringuilla (12 veces, durante 6 h en total). Tras la última adición, la reacción se mantuvo durante 2 h más en agitación. Una vez que la mezcla se enfrió (8 h), se lavó la muestra 5 veces. El primer lavado en una mezcla a proporciones iguales de H_2O y etanol (1:1) a 3300 g, 10 min, y los siguientes en etanol (3300 g, 10 min).

Una vez sintetizadas las partículas, se eliminó el surfactante (CTAB), mediante calcinación térmica a 600 ° C durante 6 h. Si las partículas no se pudieron calcinar a altas temperaturas, se utilizó un procedimiento de calcinación suave con disolventes orgánicos: la muestra se concentró en un pequeño volumen de etanol. Se añadieron 20 mL de una mezcla de tetrahidrofurano (THF)/ H_2O en proporciones de volumen 3:1 (v/v). Después, se sonicó la mezcla durante 15 min y, posteriormente se centrifugó a 3300 g durante 20 min, lavando el pellet con etanol. En el siguiente paso, se volvió a centrifugar y se redispersó la muestra en un volumen pequeño de etanol. Se añadieron de nuevo 20 mL de THF/ H_2O , esta vez en proporciones 1:3 (v/v) y se sonicó durante 15 min, repitiendo a continuación el proceso de centrifugación y lavado con etanol. Así se obtuvieron partículas de sílice mesoporosas como podemos observar en la **figura 17**.

Estas partículas de sílice mesoporosa se utilizaron para estudiar por un lado la degradación de sílice y por otro, para ver la liberación de un colorante como prueba de concepto. Como colorante se utilizó el naranja de acridina (AO; del inglés *Acridine Orange*, Sigma-Aldrich, Ref: A6014). Para ello, se incubaron 0.32 mg/mL de colorante con 8.7 mg de MSP en 10 mL de agua durante 3 h en agitación y oscuridad. El exceso de colorante se eliminó mediante ciclos de centrifugación/resuspensión en etanol (3300 g, 30 min). Para el sellado del colorante se recubrieron las partículas con polielectrolitos con carga positiva mediante la técnica de *layer-by-layer*. El revestimiento se dio esta vez o bien con PDDA o bien con Poli-L-Lisina (Poli-L-L;

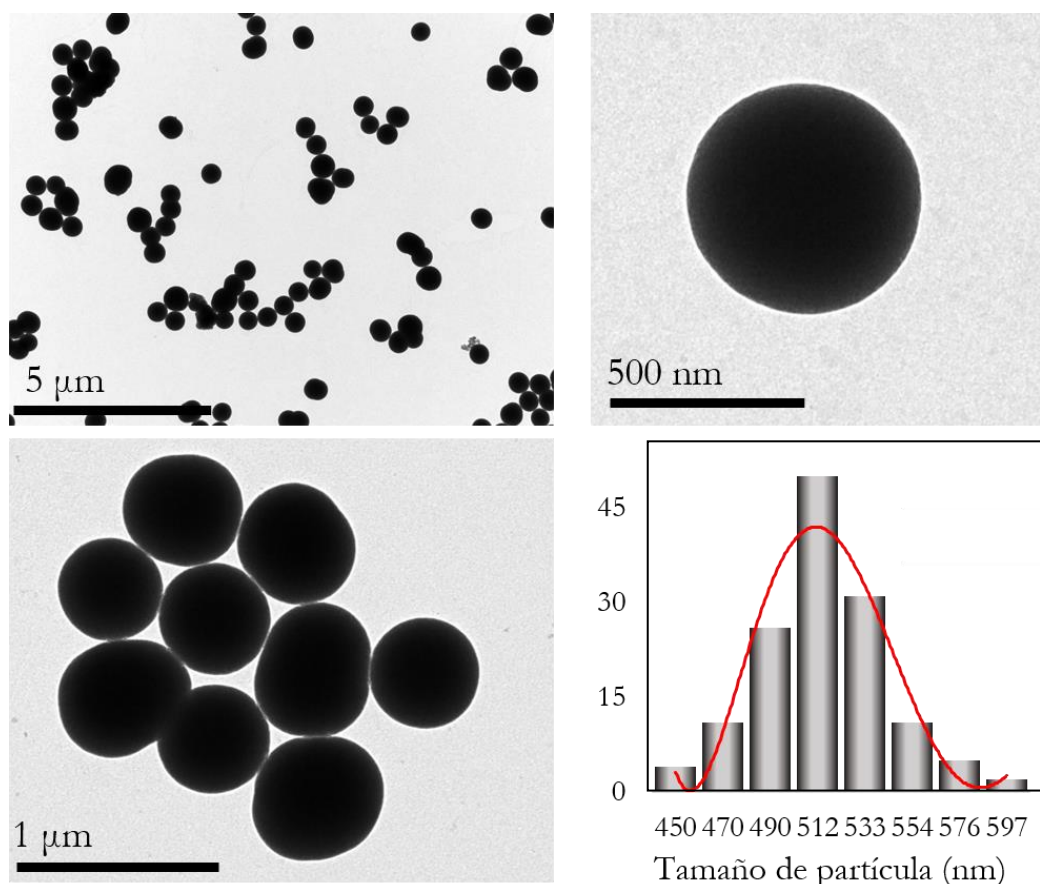


Figura 17. Diferentes imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las SMP y su distribución de tamaños.

Sigma-Aldrich, ref. P8920), con el mismo protocolo que con las partículas de sílice sólida, sólo que se utilizó 0.25 mg/mL para el caso de Poli-L-L. El exceso de polielectrolitos se eliminó con ciclos de centrifugación/resuspensión (3300 g, 30 min).

Una vez las partículas mesoporosas tuvieron carga positiva, se adsorbieron nanotubos de carbono multipared oxidados mediante el segundo procedimiento descrito anteriormente.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOMATERIALES

Se utilizaron diferentes técnicas para la caracterización de los nanomateriales como la microscopía electrónica, medida del potencial ζ y la espectroscopía, como se muestran a continuación.

2.1. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones acelerado impacta sobre una muestra ultrafina, 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. A través de esta técnica se obtiene una imagen 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 nanotubos de carbono y las partículas (**figura 15, 16 y 18**) 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). Además, también se utilizó el microscopio JEOL JEM 1010 para la caracterización que se hizo en la Universidad de Vigo bajo la supervisión del Dr. Miguel A. Correa Duarte.

2.2 MEDICIÓN DEL POTENCIAL ZETA (ζ)

A través de esta medida es posible determinar indirectamente la carga superficial y la estabilidad de las partículas (coloides). En este trabajo, se utilizó el potencial zeta para ver si el recubrimiento de las partículas de sílice mesoporosa con los polielectrolitos se había hecho correctamente. El equipo utilizado fue el Zetasizer Nano-Zs, del Departamento de Química e Ingeniería Biomolecular de la Universidad de Cantabria.

2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectroscopía ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) se refiere a espectroscopía de absorción o espectroscopía de reflectancia en la región espectral ultravioleta-visible. Esto significa que utiliza luz en los rangos visibles y adyacentes. La absorción o reflectancia en este rango afecta directamente el color percibido de los químicos involucrados. En esta región del espectro electromagnético, los átomos y las moléculas experimentan transiciones electrónicas. Con esta técnica se determinó el porcentaje de encapsulación del AO en las partículas de sílice mesoporosa, partiendo de una recta patrón con concentraciones conocidas en etanol. Para hacer dicha recta de calibrado se tomaron los valores de absorbancia obtenidos en el pico máximo de absorción de la naranja de acridina, a 490 nm. El equipo utilizado durante esta tesis fue el espectrofotómetro Cary 6000i UV-Vis-NIR, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria con la ayuda del Prof. Rafael Valiente Barroso.

3. INTERACCIÓN DE LOS NANOMATERIALES

3.1 DISPERSIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN

Para que los nanomateriales puedan ser administrados, normalmente se funcionalizan antes. La funcionalización de los nanomateriales consiste en modificar su superficie mediante o bien el recubrimiento con proteínas u otras moléculas, o bien la modificación química. En este caso, se funcionalizaron tanto los nanotubos de carbono como las partículas de sílice para su administración a las células., mediante la adsorción de proteínas séricas.

3.1.1 NANOTUBOS DE CARBONO

Para poder dispersar los nanotubos de carbono, se sonicán durante 3 minutos (20 kHz de frecuencia, 130 W) y funcionalizan en medio de cultivo con un 30 % de Suero Bovino Fetal (FBS, Life Technologies, ref. 10270-106) con el sonicador SONICS Vibra-cell VCX130 mantenido la muestra en hielo (Fanarraga *et al*, 2014). Para poder comprobar la estabilidad de la suspensión de los nanotubos de carbono, se centrifugan a 12000 g durante 10 minutos. La concentración de nanotubos de carbono se estimó mediante una recta patrón obtenida al medir directamente la absorbancia de una muestra stock (con una concentración conocida de nanotubos de carbono) a 550 nm en el colorímetro Biochrom Libra S2 (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012) (**figura 18**).

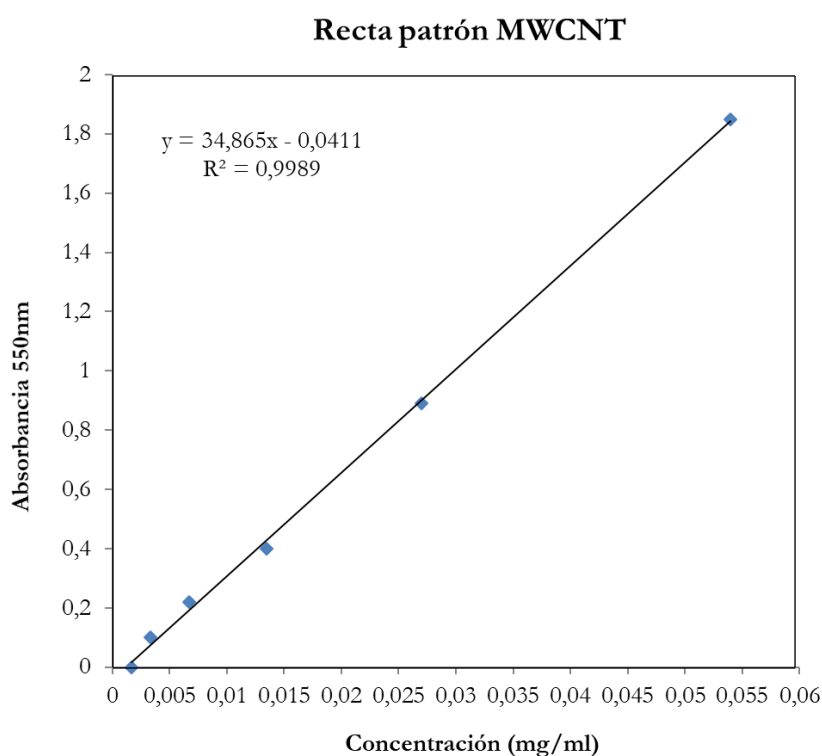


Figura 18. Recta patrón de los nanotubos de carbono

3.1.2 PARTÍCULAS DE SÍLICE

Las partículas de sílice, tanto las sólidas como las mesoporosas se resuspendieron al igual que los nanotubos de carbono, es decir, en medio celular con un 30 % de FBS, pero durante sólo 10 segundos (20 kHz de frecuencia, 130 W) en un sonicador SONICS Vibra-cell VCX13. Tras la sonicación, las partículas se añadieron al medio de cultivos celulares.

La concentración de los nanomateriales va a ser distinta dependiendo el estudio que se quiera realizar. Así, mientras que para los estudios de toxicidad se utilizaron 50-100 µg/mL de nanotubos de carbono y 150 µg/mL de partículas, para estudiar la interacción de las partículas con las células se utilizaron concentraciones de entre 5-15 µg/mL.

3.2 CULTIVOS CELULARES

Las partículas se administraron a diferentes líneas celulares dependiendo del objetivo del experimento. Todas las líneas celulares (**tabla 5**) 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 5. Las diferentes líneas celulares utilizadas durante este trabajo, su origen, el medio de cultivo y el nombre de identificación.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Identificación celular de ATCC
HeLa	Células de cáncer de cuello de útero humano	MEM 10 %	ATCC® CCL2™
J774.A1	Macrófagos de sarcoma de retículo de ratón	IMDM 10 %	ATCC® TIB-67™
B16F10	Células de melanoma maligno de piel de ratón	IMDM 10 %	ATCC® HTB-22™

Las líneas celulares se cultivaron o bien en Medio Esencial Mínimo (MEM, Life Technologies, ref. 41090-028, con GlutaMAX™, rojo fenol y sin HEPES) o Medio de cultivo Iscove de Dulbecco Modificado (IMDM, Life Technologies, ref. 21980-032, con L-glutamina y rojo fenol) (ver **tabla 5**), complementado con un 10 % de FBS inactivado (con calor, a 50 ° C durante 30 min) y filtrado. Se añadió además gentamicina a una concentración final de 10 µg/mL (LONZA, ref. BE02-012E).

3.3 CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS

Para poder estudiar la interacción de las partículas con las células se utilizaron partículas de sílice amorfa. Tras la administración de estas partículas a células HeLa, éstas se fijaron a diferentes tiempos y se sacaron 5 fotos por cada tiempo y experimento en el microscopio confocal Nikon A1R (detallado más adelante). Las imágenes digitalizadas fueron editadas con el programa ImageJ 1.48v. Después de dividir los canales en colores, se contaron los núcleos y las partículas haciendo un ajuste *threshold* (**figura 19, a**). Los núcleos se analizaron con un tamaño (pixel²) de 250 a infinito (**figura 19, b**) y las partículas de 0 a 10. Se cuantificaron las partículas dentro y fuera de las células. Para cada experimento se realizaron tres réplicas a diferentes tiempos.

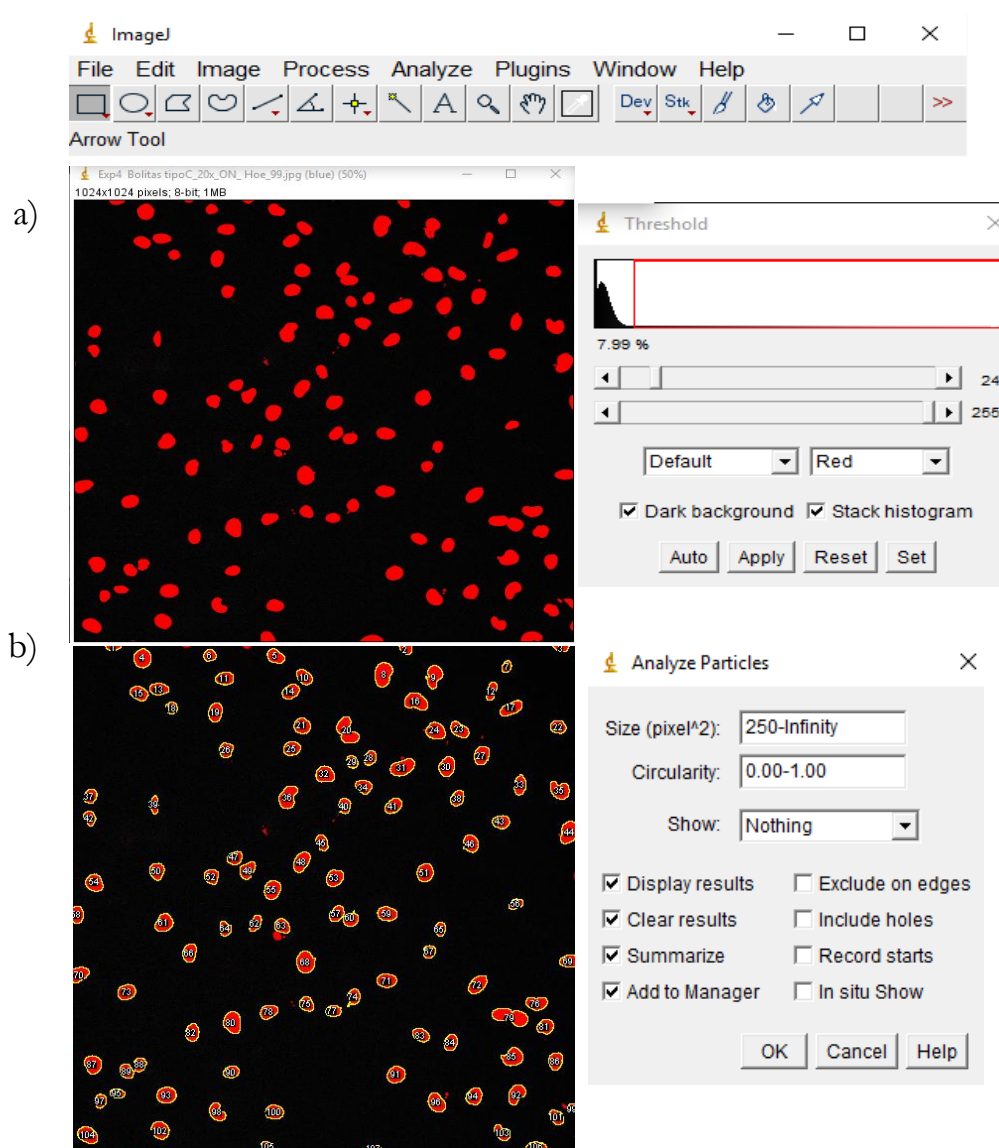


Figura 19. Ejemplo de la cuantificación de los núcleos tras la separación de los canales; a) el ajuste *threshold* y b) el análisis de los núcleos.

3.4. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para ver la posible citotoxicidad de las partículas se realizaron, por un lado, ensayos con el azul de tripán (del inglés *trypan blue*, Sigma-Aldrich, ref. T8154) para ver células necróticas, y, por otro lado, citometrías para ver posibles cambios en el ciclo y células apoptóticas.

3.4.1 AZUL DE TRIPÁN

El azul de tripán es un colorante que sólo tiñe las células muertas debido a que la membrana de estas células está permeabilizada, mientras que, en las células viables con la membrana intacta no puede penetrar. Para medir la viabilidad celular, primero se tiñeron las células con azul de tripán diluido en medio de cultivo (con una dilución 1:1), y luego se contaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico (Nikon) o mediante el equipo automático de conteo celular TC20™ Automated Cell Counter de BIO-RAD.

3.4.2 CITOMETRÍA

En la citometría de flujo, las células en suspensión se pasan a través de un pequeño orificio de modo que al salir 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. Por lo tanto, la citometría de flujo se basa en la utilización de luz láser para el recuento y 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, en aproximadamente 10.000 células por condición. Normalmente cerca del 90% de las células en un tejido o cultivo celular se encontrarán en la fase G0 y G1 del ciclo, donde no se están dividiendo, por lo que su carga cromosómica estará formada por el número de pares de cromosomas propios de la especie ($2n$). El resto de las células que están dividiéndose tendrán o bien el doble de cantidad de ADN ($4n$), y por tanto estarán listas para la mitosis, o bien se encontrarán en la fase de síntesis ciclo celular. Por ello, el histograma que representa a una población celular normal (**figura 20**), está formado por un pico alto y mayor ($2n$, correspondiente a la fase G1), una fase de meseta de las células en fase S que están sintetizando ADN (fase S), y otro pico menor ($4n$, correspondiente a las fases G2 o M). Esta técnica, por lo tanto, permite la determinación simultánea de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, así como el porcentaje las células apoptóticas.

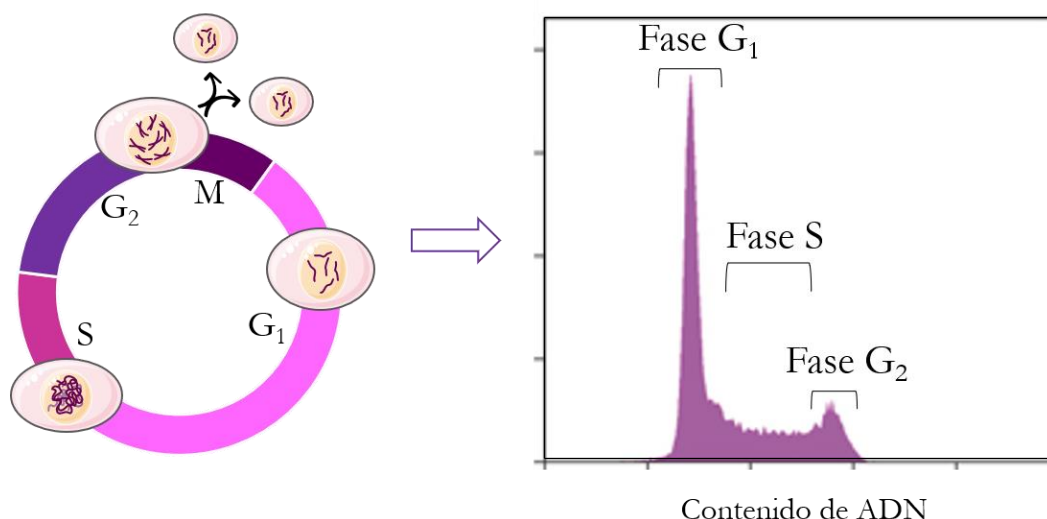


Figura 20. Diagrama de las diferentes fases del ciclo celular y su representación en la citometría de flujo.

Para ello, primero, las células expuestas a diferentes condiciones y controles se separaron, se lavaron con HBSS (solución salina equilibrada de Hanks, ref. Sigma-Aldrich: 55037C) y se centrifugan a 260 g durante 10 minutos. Una vez que quitado el sobrenadante, se agregó paraformaldehído al 4 % (PF, Electron Microscopy Sciences, ref. 15710) para fijar las células durante 15 minutos. Tras retirar el PF centrifugando la muestra a 260 g durante 10 minutos, se permeabilizaron las células agregando PBS-T 1 % (tampón fosfato salino, Lonza, Ref. 17-516F al 1 % de Tritón X-100) durante 15 minutos. Tras la permeabilización, las células fueron contadas para que todas las condiciones tuvieran el mismo número de células (un mínimo de 10^6 por mL). Asegurado este número, se añadieron aproximadamente 250 μ L de una mezcla de Hoechst 33258 (bisbenzimidazoles) (Sigma-Aldrich, ref. B1155) 1:100 y PBS-T al 0.1 % durante 12-14 horas a 4 °C. Las muestras se conservaron en PBS a 4 °C hasta el análisis.

Además del colorante Hoechst, también se utilizó el yoduro de propidio (Invitrogen, Ref: P3566). Las células en este caso fueron fijadas en hielo durante 30 minutos con etanol al 90 % (en PBS). Tras la fijación, las muestras se centrifugaron a 260 g durante 3 minutos y se lavaron con 2-5 mL de PBS. El pellet se resuspende e incuba durante 30 minutos a 37 °C (en oscuridad) con una mezcla de yoduro de propidio (12.5 μ L), RNasa (1.25 μ L, Invitrogen, Ref: 12091-021) y PBS (486.25 μ L). Después se centrifugaron las muestras para quitar el exceso de yoduro de propidio y se conservaron en PBS a 4 °C. El análisis de citometría de flujo se realizó con el citómetro de flujo FACSCanto™ (Becton-Dickinson, USA) en la Facultad de Medicina con la ayuda de Dña. María Aramburu.

3.4.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA; Sigma-Aldrich, Ref: D6883) se usa comúnmente para ver el estrés oxidativo y puede reaccionar con varias especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo peróxidos de hidrógeno, radicales hidroxilo y peroxinitrito. Este compuesto no fluorescente difunde pasivamente en las células y queda retenido a nivel intracelular donde se disocian los grupos acetato debido a la acción de las esterasas intracelulares y la oxidación. Así, el H2DCF-DA no fluorescente se convierte en la 2',7'-diclorofluoresceína, que es altamente fluorescente (DCF). Para estudiar el posible estrés oxidativo causado por la administración de las partículas, se agregó H2DCF-DA a una concentración final de 25 $\mu\text{mol/L}$ (en medio de cultivo, sin suero) durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Luego, se eliminó el medio y las células se lavaron con HBSS dos veces. Las células se suspendieron en PBS y se midió el DCF (excitación/emisión: 492-495/517-527 nm) con el citómetro CytoFLEX A00-1-1102 (Bectam Coulter), de la Unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular (UCSC) del IDIVAL. Como control positivo, las células se trataron con 100 μM de H_2O_2 .

3.5. MODELO ANIMAL

3.5.1. MODELO *IN VIVO*. RATÓN

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.

3.3.2. GENERACIÓN DE TUMORES. ALOTRASPLANTES EN RATONES.

Los experimentos se llevaron a cabo en camadas de ratones CD-1 postnatales de 2 días. La técnica consiste en un trasplante de aloinjerto de las células tumorales melanocíticas B16F10 en ratones neonatos tal y como se describe en el trabajo de García-Heví y colaboradores (García-Heví *et al*, 2016a) (**figura 21**). El tumor generado es fácilmente identificable por poseer 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. Todos los hermanos de 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 (García-Hevia *et al*, 2016a).

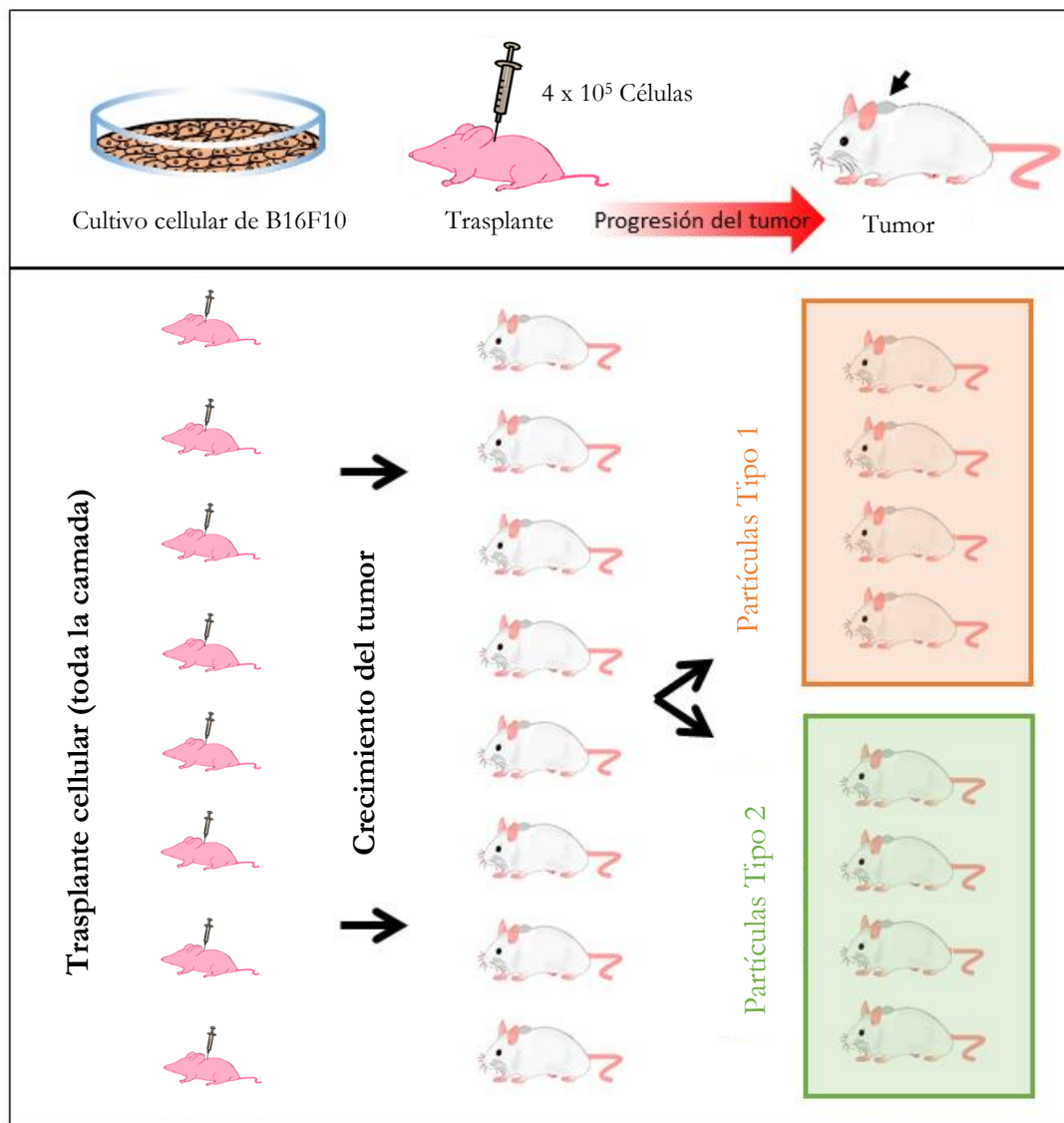


Figura 21. Esquema representativo del diseño experimental tumores melanocíticos generados en ratones. (Arriba) Pasos en el desarrollo de los órganos del tumor. La línea celular de melanoma murino se crece y amplifica in vitro. Después tiene lugar el trasplante interescapular subcutáneo de 2×10^5 células de melanoma en el ratón hospedador. Pasados unos días hay una progresión del tumor y se puede analizar la localización del tumor sólido pigmentado y su identificación (flecha). (Abajo) Diseño experimental. Una camada entera se utiliza para cada experimento. Todos los ratones de la camada se trasplantan siguiendo procedimientos idénticos. Después, los ratones portadores de tumores visibles se dividen aleatoriamente en dos grupos: cada grupo con un tipo de partículas diferente (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 3.9).
- 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 22**.
- El sistema inmunológico poco desarrollado de los ratones neonatos garantiza que no haya rechazo y exista un desarrollo completo del órgano tumoral.

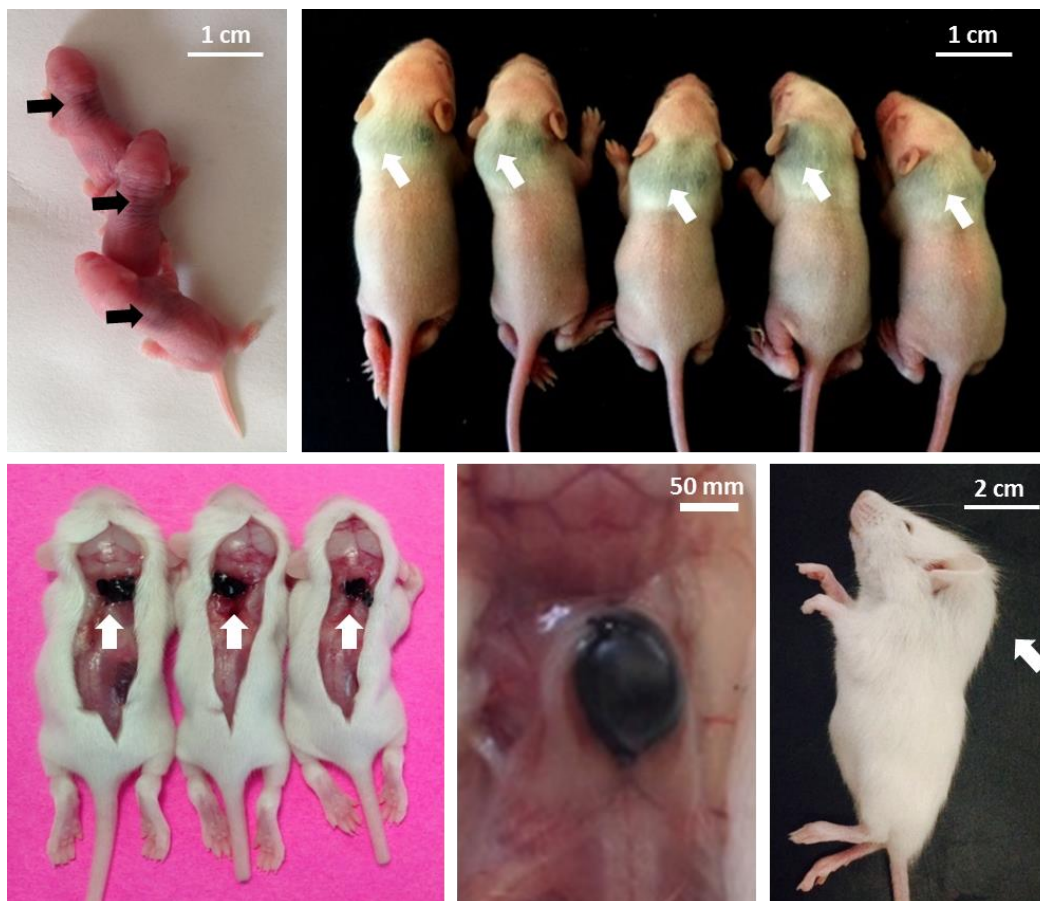


Figura 22. Imágenes de los tumores en ratones. Arriba a la izquierda: ratones con 4 días post-trasplante, las flechas apuntan al punto de inyección. A la derecha: ratones con tumores pigmentados visibles. Abajo a la izquierda: evaluación macroscópica de los tumores generados, mostrando la ubicación y el tamaño de varios tumores en ratones hermanos de 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)

3.6. MICROSCOPIA

A lo largo de este trabajo se han utilizado diferentes tipos de microscopios para poder estudiar el comportamiento celular tras la administración de los nanomateriales.

3.6.1 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

El microscopio de contraste de fases acoplado a una cámara permite la observación de células vivas sin la necesidad de agregar ningún tipo de tinte. Para las fotografías de rutina, el microscopio utilizado fue un Nikon Eclipse TS100F invertido con una cámara digital Progress CT5 (Jenoptik).

3.6.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, donde las sustancias son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente. La luz emisora siempre tendrá una longitud de onda más larga y, por lo tanto, una energía más baja que la radiación absorbida. Así, se utilizan diferentes fluoróforos para localizar diferentes partes de las células.

Para poder ver cultivos fijados en el microscopio, primero, las células deben cultivarse sobre cubreobjetos de borosilicato redondos (Thermo, ref. 0385). Luego, se fijan con PF al 4 % en PBS durante 15 minutos. Después de la fijación, las células se permeabilizan con PBS-T al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se incuban con diferentes anticuerpos o colorantes, según el experimento. Las muestras se conservan en PBS con 0.1 % de azida sódica a 4 ° C. En algunos casos los microtúbulos fueron inmunomarcados. Para ello, se usó un anticuerpo primario comercial que se une a la α -tubulina llamado B512 monoclonal de ratón, (Sigma-Aldrich, ref. T5168). El anticuerpo de cabra secundario fue el anti-IgG1 de ratón conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, refs. A11029). Las combinaciones de los anticuerpos secundarios se decidieron para evitar posibles reacciones cruzadas. Para teñir los núcleos se utilizaron las moléculas Hoechst 33258 o DAPI (Sigma-Aldrich, ref. B1155 y D8417). Para teñir filamentos de actina se usó el isotiocianato de faloidina tetrametilrodamina B (Sigma-Aldrich, ref. P1951). Los endolisosomas se tiñeron con AO o con LysoTracker® Deep Red (Thermo Fisher, Ref: L12492). Ambas sondas tiñen los compartimentos ácidos, como los endolisosomas, produciendo una emisión verde e infrarroja cuando se excitan con luz azul y roja respectivamente. El AO es un fluoróforo metacromático que difunde en las células y se acumula en los lisosomas mediante la captura de protones. Esta acumulación produce un cambio en la emisión de fluorescencia de la sonda (de verde en el citosol a rojo dentro de los lisosomas dependiente de la concentración del colorante).

Una vez que las células se fijan y se tiñen, las muestras se montan en un porte con medio de montaje Immu-Mount (Thermo, ref. 9990402).

3.6.2.1 Microscopía de epifluorescencia

En el microscopio de epifluorescencia convencional, la muestra se ilumina con un rango de longitudes de onda que se seleccionan con un filtro. La imagen obtenida es el resultado de la radiación emitida por las moléculas que han sido excitadas. Para detectar solo la emisión deseada, se utilizan filtros apropiados que se colocan debajo del condensador y en la parte superior de la lente. Se pueden observar muestras que previamente se han teñido con un fluoróforo o a las cuales se ha realizado una preparación inmunofluorescente o que sean naturalmente fluorescentes.

Durante esta tesis, la epifluorescencia se ha usado para experimentos de rutina y para imágenes de célula viva. Para la microscopía de epifluorescencia convencional, se ha utilizado el microscopio Zeiss Axiovert 200M así como el ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO RAD, Ref. 1450031) para experimentos de rutina. Las imágenes de célula viva se realizaron con un microscopio de epifluorescencia para videomicroscopía NIKON Ti equipado con una amplia combinación de sets de filtros, incubador de metacrilato y con sistemas automáticos de mantenimiento de foco, usando el objetivo de 20x. Este microscopio permite tomar fotografías en ciertos intervalos de tiempo para luego unir las y crear así una película, llamada microscopía *time-lapse*.

3.6.2.2 Microscopía 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. La microscopía láser confocal es una forma de tomografía óptica de fluorescencia. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente que sale de los planos fuera de foco. Para esto, el sistema consta de dos diafragmas (*pinhole*), uno entre la fuente de luz y el objetivo, y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos deben estar perfectamente alineados para que el segundo de ellos solo permita que la luz del plano focal llegue al detector. Con esta técnica, se logran imágenes de secciones ópticas extremadamente finas, eliminando la interferencia producida por la luz proveniente de los otros campos focales de todo el espesor de la muestra, obteniendo el foco en un solo plano (confocal). Varios de estos planos confocales obtenidos a lo largo del eje “Z” sirven para proyectarlos o para hacer una reconstrucción tridimensional de la muestra.

El microscopio utilizado fue un Nikon A1R equipado con varias líneas de láseres (λ : 405, 488, 514, 561, 633 nm) y con dos sistemas de detección: por filtros en cuatro canales y espectral de 32 canales con tres rejillas de difracción diferentes. 10x PlanApo 0,45 N.A. 20x Plan Apo VC 0,75 N.A. 40x PlanFluor 1,3 N.A. 60x PlanApo VC 1,4 N.A. 100x Apo TIRF 1,49 N.A.

3.5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN

Con la microscopía electrónica de transmisión, además de caracterizar las partículas, también se pueden obtener secciones ultrafinas de células fijadas. Para analizar muestras biológicas, el microscopio electrónico utilizado fue el JEM 1011 (JEOL) del IDIVAL.

Para ello, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron durante 15 minutos con glutaraldehído al 3 % (Sigma-Aldrich, ref. G5882) en tampón fosfato 0.12 M (pH 7.4). La post-fijación se realizó durante 2-4 h en tetróxido de osmio al 2 % a temperatura ambiente en agitación. Después de varias etapas de lavado con tampón fosfato 0.12 M, las muestras se deshidrataron en una serie gradual de acetonas:

- Acetona 15 %, 5 minutos.
- Acetona 30 %, 15 minutos.
- Acetona 50 %, 15 minutos.
- 70 % de acetona + 1 % de acetato de uranilo, 2 h
- Acetona 70 %, 10 minutos.
- Acetona 80 %, 15 minutos (dos pasos)
- Acetona 90 %, 15 minutos (dos pasos)
- Acetona anhidra, 15 minutos (dos pasos)
- Óxido de propileno, 30 minutos (dos pasos)

Posteriormente, las muestras se integraron en una resina tipo Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, ref. 44611) y la polimerización se llevó a cabo en un horno a 65 °C durante 48 h. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT). Se realizaron cortes semifinos de 1 μ m de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 1 % para valorar la correcta preservación del material. Los cortes ultrafinos de 60 nm se montaron en rejillas de níquel y se tiñeron con acetato de uranilo antes de su visualización, todo este procesamiento para TEM se llevó a cabo en colaboración los Prof. Juan Carlos Villegas e Íñigo Casafont, especialistas en biología celular y miembros del grupo de Nanomedicina.

3.6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En el microscopio electrónico de barrido (SEM), la muestra se recubre con una capa metálica delgada y se barre con electrones lanzados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad del área de muestra, pudiendo mostrar figuras en tres dimensiones.

Durante esta tesis se utilizó este tipo de microscopía en células HeLa expuestas a partículas funcionalizadas con suero. Para ello se fijaron las células con glutaraldehído al 1 % en tampón fosfato 0.12 M. Se utilizó el microscopio JEOL JSM-6700F, en colaboración con el Dr. Miguel Correa Duarte en la Universidad de Vigo. Para la caracterización de las partículas se utilizó el equipo FEI Quanta 650 FEG del *International Iberian Nanotechnology Laboratory* (INL) en colaboración con el Dr. Manuel Bañobre López y Dra. Lorena García Hevia.

4. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-OES)

Esta técnica es un tipo de espectroscopía de emisión que utiliza plasma acoplado por inducción para producir átomos e iones excitados que emiten radiación electromagnética en longitudes de onda características de un elemento en particular. La intensidad de esta emisión es indicativa de la concentración del elemento dentro de la muestra, por lo que es una medida cuantitativa. Así se utilizó esta técnica para observar la degradación de las partículas de sílice en cultivos celulares de HeLa y J774 A1. Se recogió por tanto, el medio extracelular y se centrifugó a 20600 *g* durante 30 minutos para poder descartar las posibles partículas extracelulares o semi-degradadas. El equipo utilizado fue el Perkin Elmer Optima 4300 DV, que se encuentra en la Universidad de Vigo. Se utilizó en colaboración con el grupo del Dr. Miguel A. Correa Duarte.

5. ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

Para poder estudiar la liberación del AO *in vitro*, se utilizaron partículas de sílice mesoporosa, selladas con diferentes polielectrolitos (descritos anteriormente). Estas partículas fueron incubadas a diferentes tiempos (24 h, 72 h, 1 semana y 2 semanas) en PBS y en medio lisosomal sintético (pH 4.5), así como en aguas a diferentes pHs.

En la espectroscopía de fluorescencia, la muestra se excita desde su estado electrónico fundamental hasta uno de sus estados excitados, generalmente mediante luz UV. Las colisiones

entre moléculas causan una pérdida de energía vibratoria hasta que se alcanza el estado vibratorio 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. Dado que 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, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante y midiendo las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra (utilizando un monocromador), podemos obtener el espectro de emisión. Para obtener un espectro de excitación, la luz emitida se mantiene constante a una longitud de onda determinada, y la muestra se va excitando a diferentes longitudes de ondas mediante un monocromador, recogándose las emisiones para cada longitud de onda de excitación. El equipo utilizado en esta tesis fue el espectrofluorímetro Edinburgh Instruments (FLSP920) equipado con dos monocromadores (para excitación y emisión). Consta, además, de detectores para visible, extendido visible y InGaAs y una lámpara continua de Xe de 450 W. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron con la ayuda del Prof. Rafael Valiente Barroso del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria.

6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para todos los estudios estadísticos, se utilizó la prueba t de Student. En las diferentes gráficas se describe el valor t de cada prueba así como los grados de libertad y significancia. Las diferencias se consideraron no significativas cuando $p \geq 0.05$, significativas cuando $p < 0.05$ (*), muy significativas si $p < 0.01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0.0005$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software SigmaPlot 8.0 o Excel 2016.

IV. Resultados y Discusión

“No temas a las dificultades, lo mejor surge de ellas”

Rita Levi-Montalcini

1. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Uno de los grandes problemas en el tratamiento de diferentes enfermedades como las neurodegenerativas y el cáncer es la falta de direccionamiento de la terapia. El descubrimiento de las propiedades ópticas, eléctricas y estructurales de los nanomateriales en aplicaciones biomédicas ha supuesto una gran revolución para el área del transporte y la liberación controlada de fármacos. Para poder diseñar un sistema de liberación basado en nanotecnología que sea capaz de dirigir diferentes tipos de terapias (como fármacos, ADN o proteínas), es necesario que el transportador cumpla diferentes características entre las que podemos destacar la especificidad, la biocompatibilidad, la degradación y la posibilidad de controlar dicha liberación. Sin embargo, no todos los nanomateriales cumplen con todas estas características. Nuestro grupo de investigación propone como solución la combinación de diferentes nanomateriales, para poder compaginar las diferentes ventajas de estos y darle un gran valor añadido gracias al desarrollo de sistemas multiestructurados.

El trabajo de nuestro laboratorio ha centrado sus estudios en entender la relación biosintética de los nanotubos de carbono con proteínas, células y tejidos, intentando desarrollar técnicas para mejorar su biocompatibilidad, por ejemplo aumentando su degradación mediante la oxidación de su superficie (González-Lavado *et al*, 2018).

En el diseño del sistema multiestructurado proponemos utilizar una cubierta de nanotubos de carbono oxidados que uniremos a partículas de sílice de 500 nm de diámetro. Este núcleo de sílice nos servirá, en un futuro, como nanotransportador para el encapsulamiento de diferentes fármacos. Mientras que la cubierta de nanotubos de carbono podrá servir como mecanismo para atravesar membranas (Al-Jamal *et al*, 2011; Lacerda *et al*, 2012), así como para hacer que las partículas salgan de las membranas endolisosomales.

Para comprobar si el diseño que se propone en este trabajo puede ser funcional y eficaz hay que entender el comportamiento de estas estructuras en contacto con las células. Por eso vamos a estudiar la interacción de nuestro sistema con un modelo celular humano bien caracterizado como es el de las células HeLa. También estudiaremos la distribución de estas partículas en el interior celular, su toxicidad y degradación. Por último analizaremos también, cómo la degradación de las nanopartículas puede influir en la liberación de un colorante (a modo de prueba de concepto) en diferentes medios.

2. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS SiO_2

Para el diseño de este sistema se utilizó una cubierta de nanotubos de carbono multipared oxidados debido a su gran relación superficie-volumen y su capacidad para atravesar membranas. El sistema propuesto en este trabajo tiene un núcleo de sílice de 512 nm de diámetro con una dispersión de tamaño baja de 18 nm (**figura 23**).

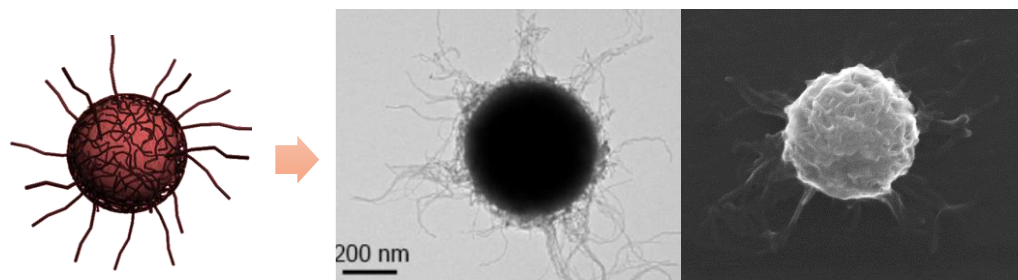


Figura 23. Diseño de las partículas de sílice con un recubrimiento de nanotubos de carbono ($\text{SiO}_2\text{-CNT}$). (Izquierda) Diagrama del modelo que se propone, (derecha) Imagen de microscopía electrónica de transmisión y de barrido de las partículas diseñadas.

Como control se van a usar las mismas partículas de sílice sin nanotubos de carbono. Como se ha descrito en materiales y métodos, los mismos nanotubos de carbono (de carga superficial negativa) están unidos a las partículas (también de carga superficial negativa) electrostáticamente mediante polielectrolitos positivos (por el método *layer-by-layer* (Sukhorukov *et al*, 1998)). Se utilizarán diferentes polielectrolitos dependiendo el tipo de experimento que se vaya a realizar.

Para la administración de cualquier nanomaterial a las células, incluido nuestro modelo de estudio, es recomendable su funcionalización (**figura 24**). Por ello, todas las partículas de SiO_2 fueron sonicadas con 30 % de FBS mediante sonicación en punta (descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos). De esta manera se consigue que los nanotubos de carbono y las partículas adsorban proteínas en su superficie formando una biocorona que facilita su reconocimiento y entrada mediante endocitosis mediada por receptores en las células

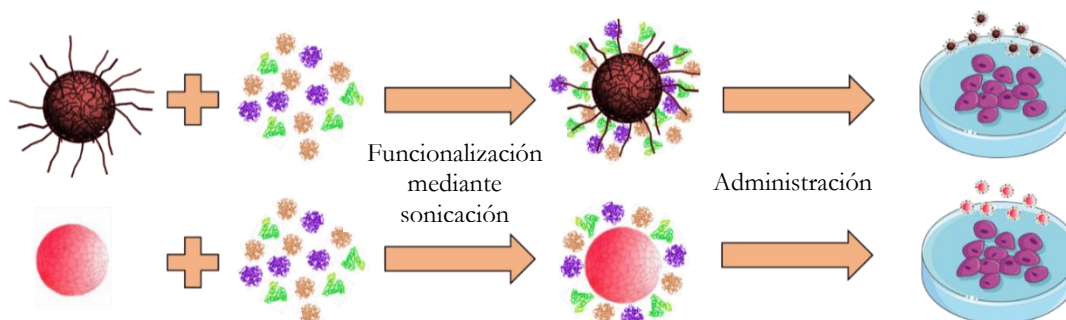


Figura 24. Esquema representando la funcionalización y la posterior administración de las partículas a cultivos celulares. (Arriba) La funcionalización y administración de las partículas de $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ y (abajo) las partículas SiO_2 .

(Westmeier *et al*, 2015). Esta biocorona proporciona una identidad biológica a los nanomateriales (Monopoli *et al*, 2012).

3. INTERACCIÓN DE LAS PARTÍCULAS CON CÉLULAS HeLa

Para poder estudiar la eficacia del sistema, lo primero es determinar la vía de entrada de las partículas a las células. Esta internalización, en general, se discute con frecuencia ya que depende de: propiedades fisicoquímicas del propio material (tamaño, forma, carga superficial), de la concentración, del tiempo de incubación, del tipo celular, etc. (Chung *et al*, 2007; Chithrani & Chan, 2007; Brunner *et al*, 2006; Hu *et al*, 2011).

Para estandarizar el experimento y considerando las posibles variables que influyen en la entrada de los materiales, se emplearon partículas control y SiO₂-CNT con aproximadamente el mismo tamaño y forma. Éstas se incubaron a la misma concentración, el mismo tiempo y en el mismo tipo celular. Para el estudio se administraron 5 µg/mL de ambas partículas a cultivos celulares de HeLa y se observaron a tiempos cortos mediante microscopía de célula viva (**figuras 25, 26**) y microscopía electrónica de barrido (**figura 27**). En estas imágenes se puede observar que la entrada de las partículas con nanotubos de carbono (**figura 26, 27**) es diferente a la entrada de las partículas control (**figura 25, 27**). Estos resultados desvelaron cómo los nanotubos de carbono facilitaban el contacto de las partículas con las proyecciones citoplásmicas de las células, haciendo que se transporten activamente hacia el cuerpo celular.

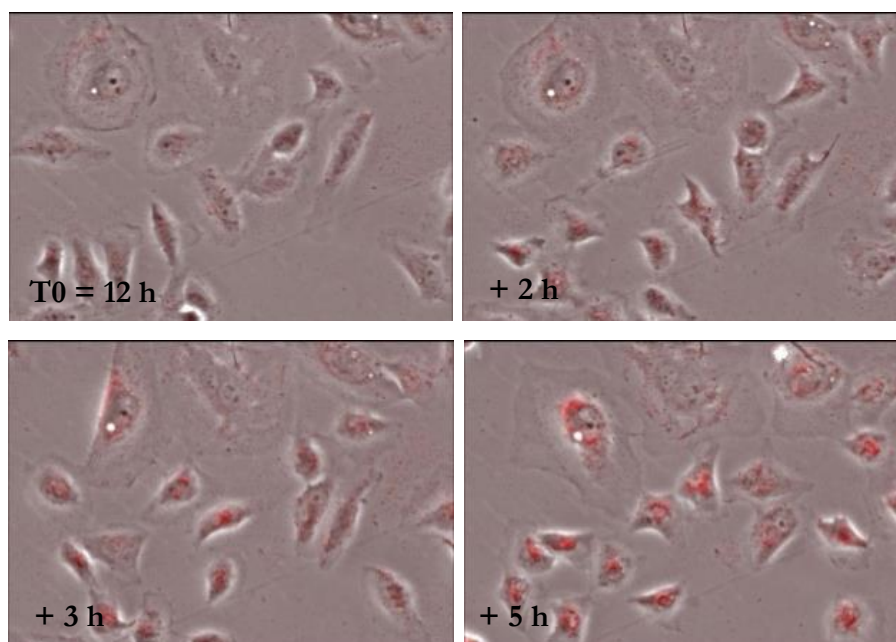


Figura 25. Imágenes de microscopía de epifluorescencia y contraste de fase en célula viva.
Fotogramas de células HeLa tras 12 h desde la administración de partículas SiO₂.

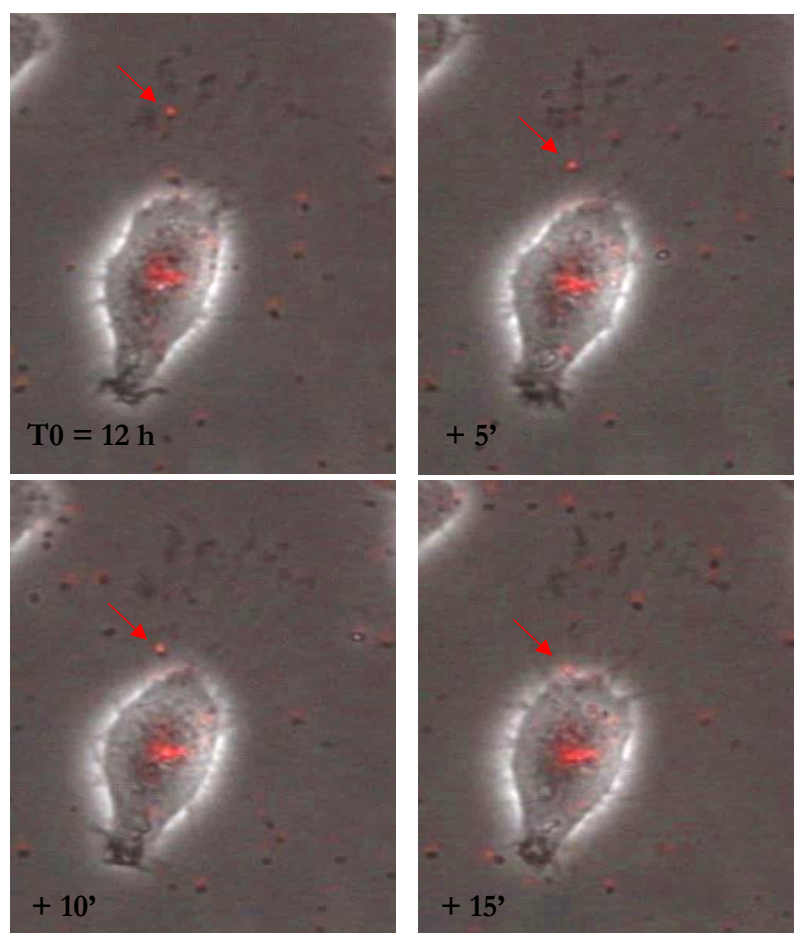


Figura 26. Imágenes de microscopía de epifluorescencia y contraste de fase en célula viva. Fotogramas de células HeLa tras 12 h desde la administración de partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$. Las flechas rojas señalizan una partícula deslizando por una extensión citoplasmática de la célula.

Este fenómeno se puede observar tanto en los fotogramas de la **figura 26** (flechas rojas) como en las imágenes de SEM (**figura 27**, flechas blancas), donde se observan una serie de filopodias rodeando las partículas localizadas sobre la superficie celular. Procesos similares se han descrito en la entrada de algunos virus (Lehmann *et al*, 2005; Schelhaas *et al*, 2008; Chang *et al*, 2016) que al entrar en contacto con la célula diana, se unen a su receptor de una manera muy específica. Esta unión del ligando a su receptor da lugar a cambios conformacionales que producen la unión al citoesqueleto de actina subyacente y a un transporte retrógrado de la filopodia (Lehmann *et al*, 2005; Lidke *et al*, 2005) (ver **figura 28**). Los filamentos de actina sufren una renovación constante que es inducida por el "empuje" del ensamblaje en la punta y la "tracción" impulsada por la miosina II en la base del filamento de actina (Medeiros *et al*, 2006). En consecuencia, los virus terminan "surfeando" hacia el cuerpo celular (Lehmann *et al*, 2005; Cossart & Helenius, 2014; Burckhardt & Greber, 2009; Mothes *et al*, 2010; Smith *et al*, 2008), utilizando el movimiento generado por la actina cortical (Burckhardt & Greber, 2009; Sherer *et al*, 2010, 2007).

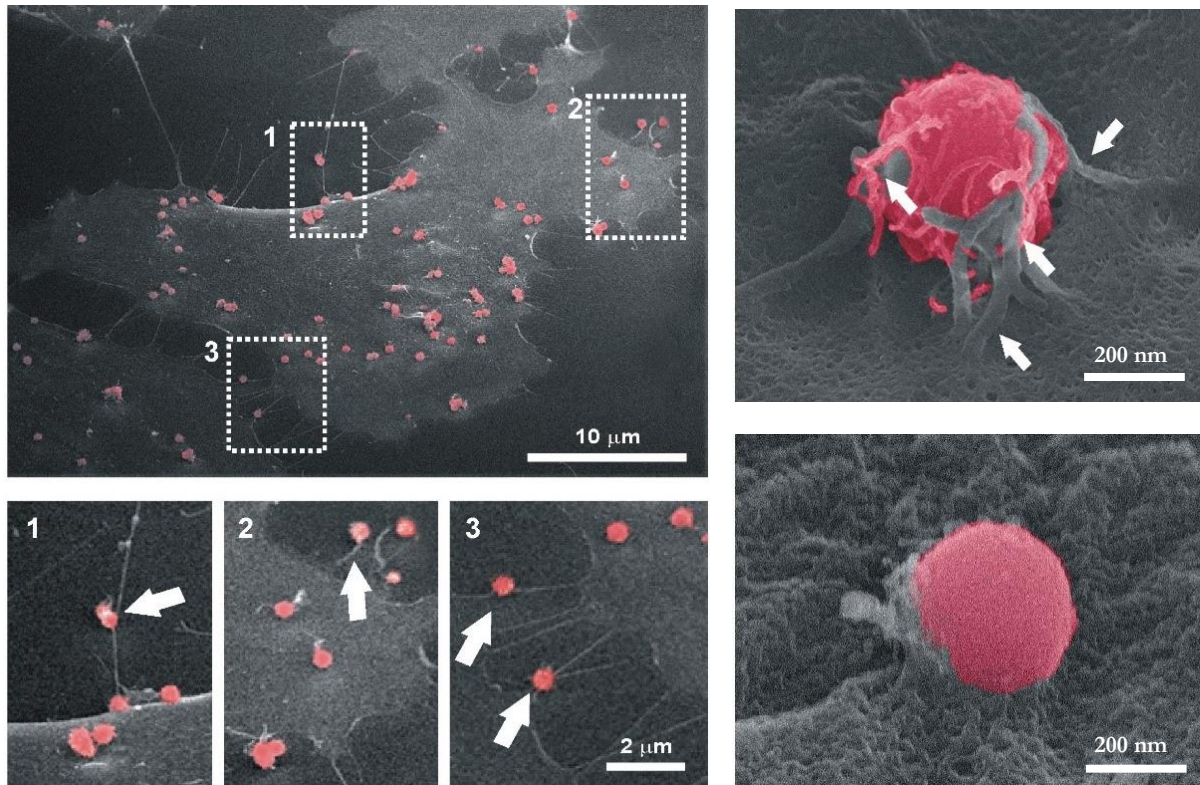


Figura 27. Imágenes de SEM de células HeLa con partículas que fueron administradas dos veces, a los 15 minutos y 1 h después. En las imágenes de la izquierda se observan células con SiO₂-MWCNT, a la derecha, imágenes tanto de partículas con nanotubos de carbono (arriba) como sin nanotubos (abajo). Las imágenes se han coloreado para que sea más fácil el reconocimiento de las partículas. Las flechas blancas de las zonas ampliadas (1, 2 y 3) representan las proyecciones citoplasmáticas.

Sin embargo, las partículas sin recubrimiento de nanotubos de carbono no parecen utilizar este mecanismo de entrada. Estas partículas son capturadas por extensiones membranas similares a láminas, conocidas como *lamelipodias*, que forman "copas" endocíticas, para así interiorizar las partículas (**figura 27, derecha, abajo**).

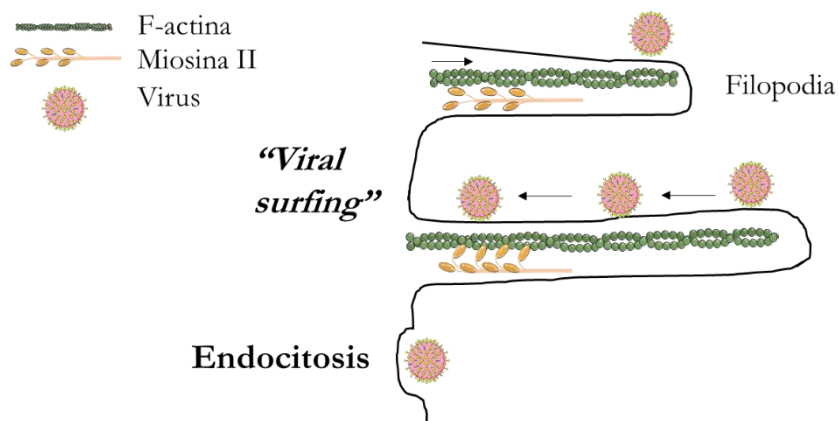


Figura 28. Representación esquemática del "viral surfing" por las filopodias inducidas por virus donde participan los filamentos de actina (F-actina) y la miosina II, y la posterior endocitosis del virus.

Tras comprobar que la vía de entrada de las partículas con nanotubos de carbono era diferente, se calculó la velocidad de entrada de ambos tipos de partículas. Se cuantificó el número de partículas dentro y fuera de las células HeLa mediante imágenes de microscopía confocal a bajos aumentos con el programa “Image J” (detallado en el apartado 3.3 de materiales y métodos). El gráfico de la **figura 29** muestra que las partículas que tienen nanotubos de carbono entran más rápido y en mayor proporción que las partículas de SiO₂. Se observa que tras 2 h de exposición a las nanopartículas, casi un 40 % de las partículas que tienen nanotubos de carbono se encuentran en el interior celular, mientras que, de las partículas control sólo ha entrado un 20 %.

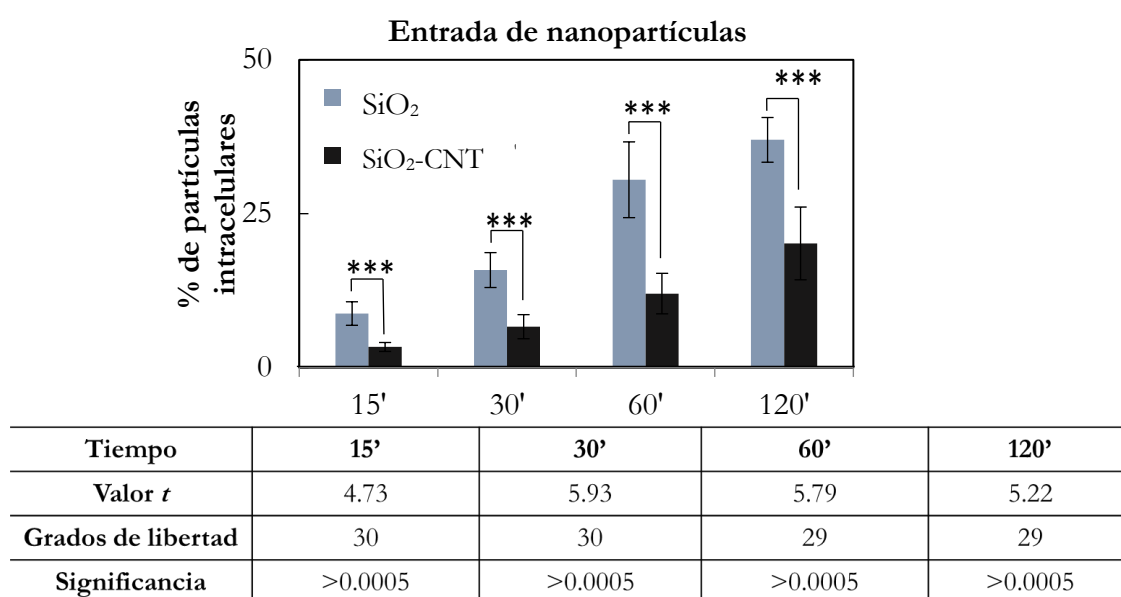


Figura 29. Histograma resultado de la cuantificación de las partículas intracelulares a diferentes tiempos, en células HeLa, teniendo en cuenta que en 12 h se considera que han entrado el 100 % de las partículas y tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

Además, en las imágenes de microscopía confocal de la **figura 30** se observa cómo hay más partículas SiO₂-CNT dentro de las células que partículas SiO₂ tras 30 minutos de exposición y posterior lavado (flechas blancas).

Estos resultados demuestran cómo la cobertura de nanotubos de carbono puede favorecer la velocidad de captación de las partículas de sílice por las células añadiendo un gran valor añadido a este diseño.

Partículas / Núcleos / Actina

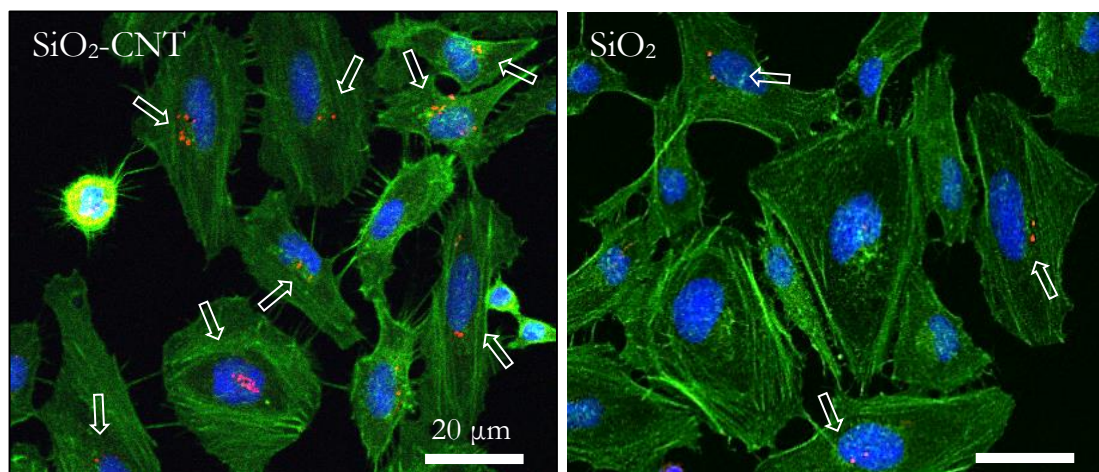


Figura 30. Imágenes de microscopía confocal donde se observan células HeLa tras 30 minutos de exposición a partículas SiO_2 -MWCNT (izquierda) y SiO_2 (derecha).

4. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR

Una de las propiedades más importantes que deben tener los sistemas de transporte y liberación de fármacos es la posibilidad de proteger la terapia del ambiente lisosomal y liberarla al citosol. Tras comprobar que el sistema es capaz de entrar a las células por la vía endocítica estudiaremos su localización intracelular.

Para ello, se tiñeron las células simultáneamente con Lysotracker® y naranja de acridina. El Lysotracker® tiene una alta selectividad para orgánulos ácidos por lo que es ideal para estudiar los endolisosomas en células vivas. En la **figura 31** se observan las células teñidas con naranja de acridina para ver su contorno (en el canal verde), las partículas en el canal rojo y el Lysotracker® en el canal azul. Se puede apreciar cómo los canales rojo y azul, que recogen las señales de los endolisosomas y las partículas, simultáneamente, colocalizan (flechas moradas), debido a la superposición de las partículas con los endolisosomas, demostrando así que tras su entrada por endocitosis mediada por receptores, las partículas de SiO_2 (izquierda) y las SiO_2 -CNT (derecha) se encuentran dentro de las membranas de la ruta endolisosomal (Al-Rawi *et al*, 2011).

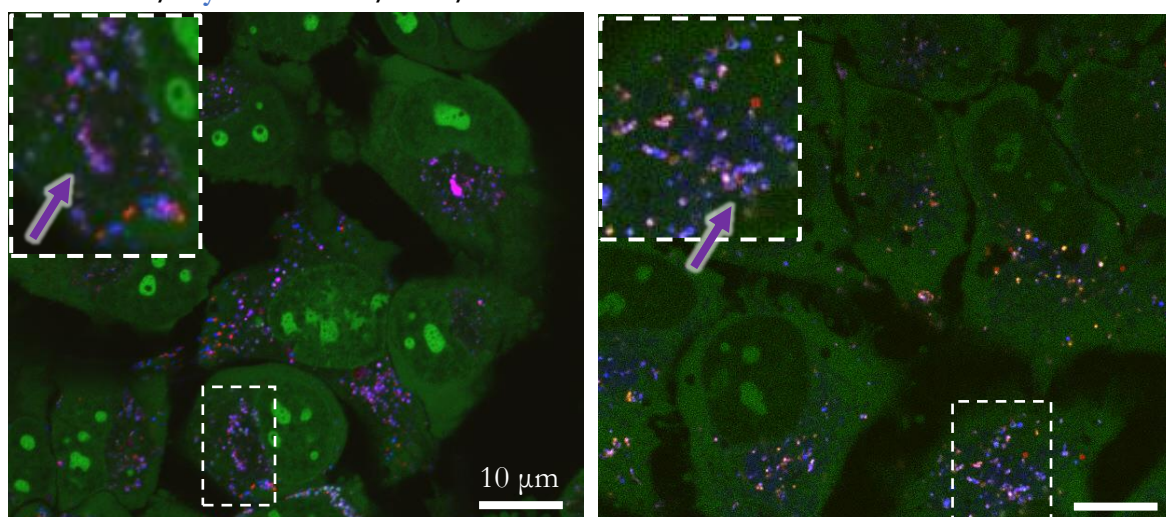
Partículas / Lysotracker® / AO / Partículas endo-lisosomales

Figura 31. Partículas con y sin nanotubos de carbono en la ruta endolisosomal. Imágenes de planos Z confocales de células vivas teñidas con naranja de acridina (verde) y lysotracker® (azul) expuestas a partículas SiO_2 (izquierda) y SiO_2 -CNT (derecha). Se observa como ambas partículas se encuentran en el interior de vesículas ácidas tras 12 h de su administración.

La distribución subcelular de las partículas también se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión en la **figura 32**, pudiendo observarse tanto la entrada de las partículas (A y D), como la localización endosomal (B, C, E y F). A tiempos más largos de exposición (48h, 72h, 96h), se observó que la mayoría de las partículas control se encontraban o recubiertas por una membrana en el interior celular (dentro de vesículas) (ver **figura 33**), o en el exterior de la célula (**figura 34, A**).

La cuantificación mediante el programa Image J del número de partículas extracelulares con respecto al total de partículas a tiempos cortos (habiendo lavado el medio previamente) verificó que alrededor de un 30 % de las partículas se encontraban siempre en el medio extracelular (**figura 34, B**). Este resultado se investigó en otro experimento, incubando las partículas a tiempos más largos. Tras 12 h de incubación, las células fueron lavadas y se dejaron durante 30', 60', 120', 3 h, 4 h, 6 h y 12 h más (**figura 35, A**). Se cuantificaron las partículas extracelulares tras esos tiempos, y se observó que las partículas sin nanotubos de carbono eran capaces de sufrir ciclos de endocitosis/exocitosis continua, donde un 30 % de las partículas se encontraba en el espacio extracelular (**figura 35, B**).

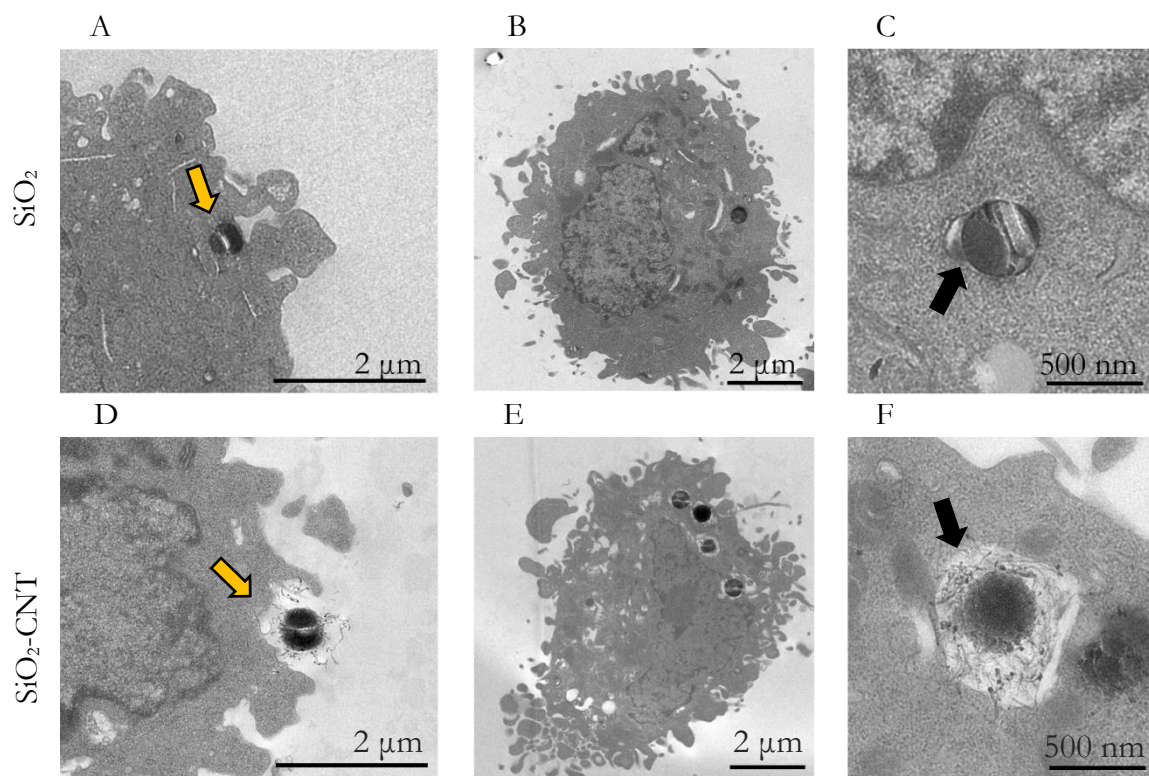


Figura 33. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas de células HeLa con partículas SiO_2 (arriba) y $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ (abajo) tras 24 h de su administración. A y D representan la entrada por endocitosis de ambas partículas (flechas amarillas), B y E muestran una célula HeLa entera con partículas intracelulares, y C y F muestran en aumento una partícula dentro de un endo-lisosoma (flechas negras).

Aunque no ha sido ampliamente estudiada, la exocitosis de nanomateriales se ha descrito para nanopartículas de oro, PLGA, superparamagnéticas, puntos cuánticos y partículas de sílice entre otras, en diferentes tipos celulares como fibroblastos, células tumorales, células endoteliales o macrófagos (Oh & Park, 2014; Hu *et al*, 2011; Slowing *et al*, 2011). Por ello, la siguiente pregunta a contestar era si las partículas de sílice estaban fuera tras haber sido endocitadas.

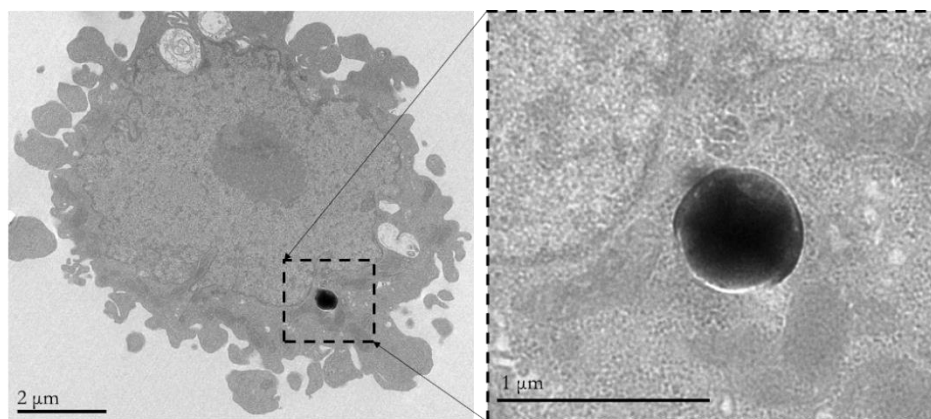


Figura 32. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando una partícula recubierta con membrana tras 72 h de su administración.

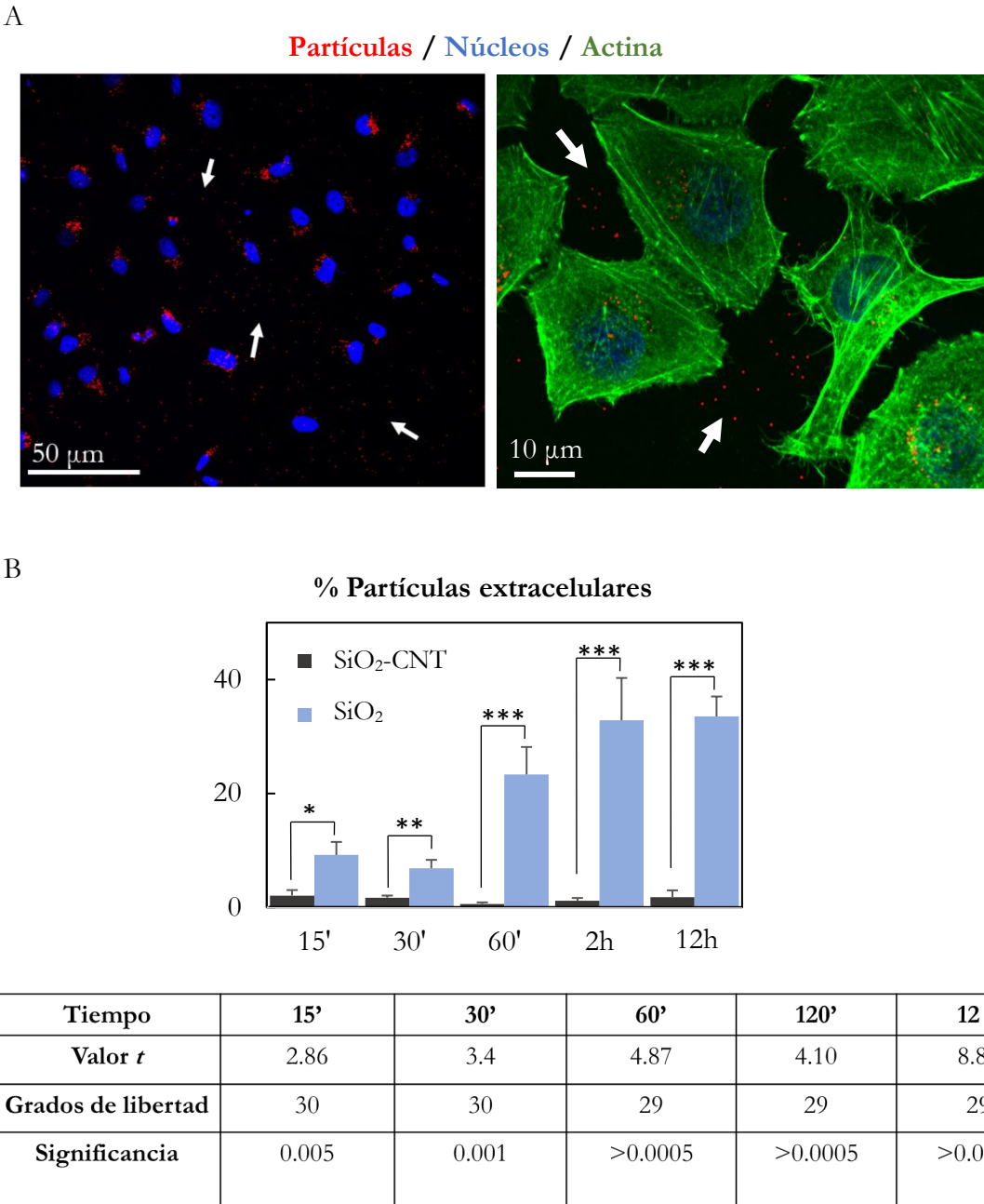
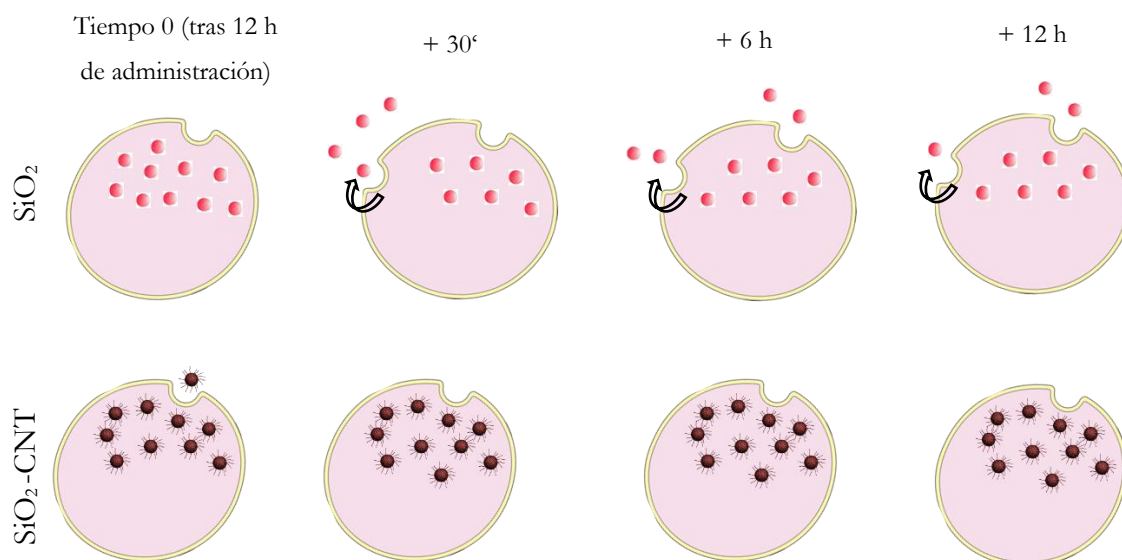
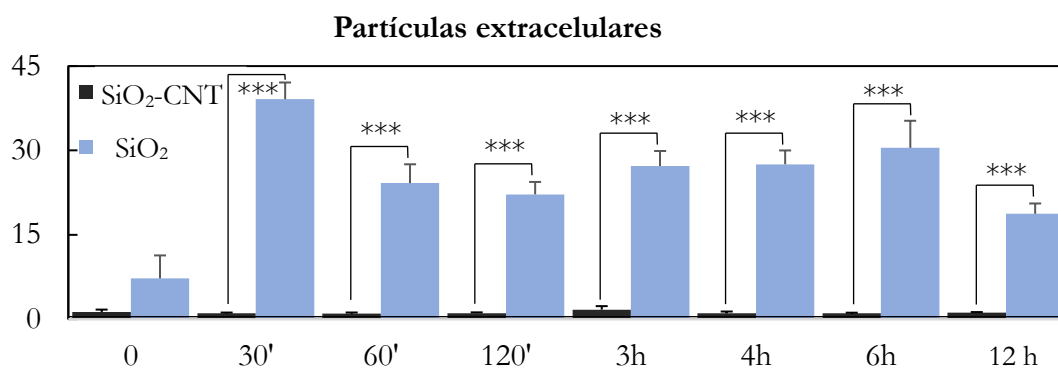


Figura 34. Estudio de las partículas extracelulares a tiempos cortos (A) Imágenes de microscopía confocal donde se observan el rojo partículas tanto dentro como fuera (flechas blancas), (B) diagrama de barras representando el porcentaje de partículas extracelulares tras 15, 30, 60, 120 minutos y 12 h y la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la t de student, los grados de libertad y la significancia.

A



B



Tiempo	0	30'	60'	120'	3 h	4 h	6 h	12 h
Valor <i>t</i>	1.45	12.80	6.90	9.53	9.31	10.65	6.11	9.57
Grados de libertad	8	8	8	8	8	8	8	8
Significancia	NO	>0.0005	>0.0005	>0.0005	>0.0005	>0.0005	>0.0005	>0.0005

Figura 35. Estudio de las partículas extracelulares a tiempos largos. (A) Esquema representando el experimento realizado para corroborar el porcentaje de partículas de sílice extracelulares, (B) Diagrama de barras representando el porcentaje de partículas SiO₂ y SiO₂-CNT extracelulares y la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

Para estudiar la exocitosis de las partículas de sílice se llevaron a cabo dos experimentos diferentes. Por un lado, se cultivaron células HeLa con partículas marcadas con rodamina y partículas marcadas con fluoresceína por separado, y posteriormente se co-cultivaron los dos cultivos de células HeLa durante 24 h. Las células con las partículas rojas se tiñeron con Hoechst, un colorante azul que tiñe los núcleos, para su fácil identificación (**figura 36**).

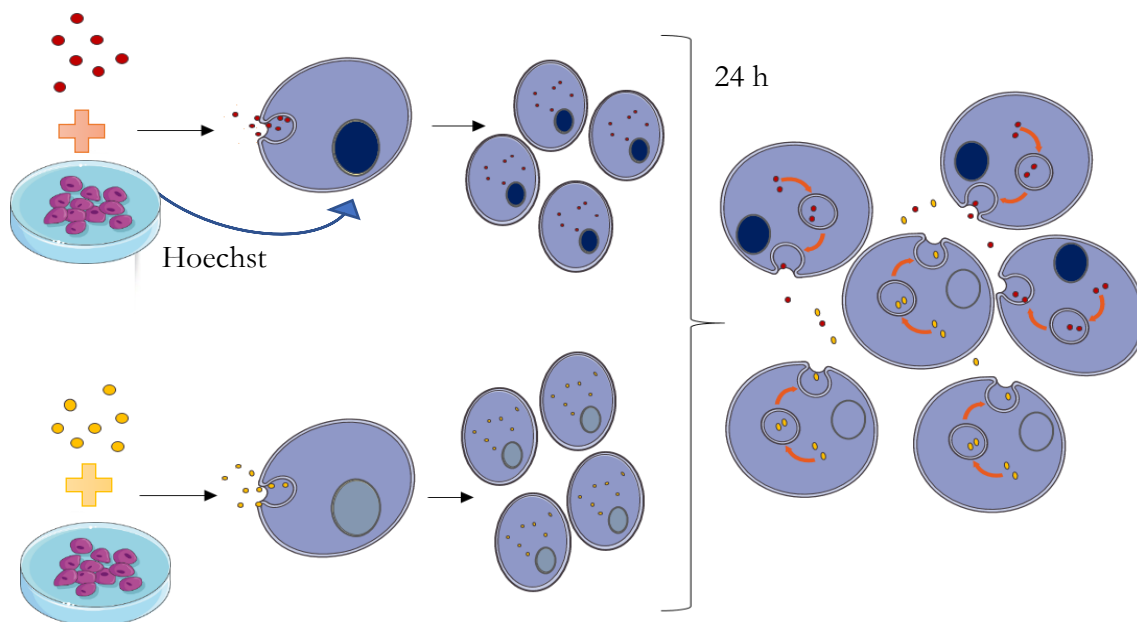


Figura 36. Esquema representando el estudio de exocitosis-endocitosis planteado donde se co-cultivan células HeLa tras la administración de partículas SiO_2 marcadas con rodamina o fluoresceína por separado.

Como se observa en la **figura 37** tras el co-cultivo, las células HeLa mostraban partículas intracelulares de ambos colores, lo que sugiere que las partículas habían sido exocitadas de unas células siendo re-endocitadas posteriormente por células próximas.

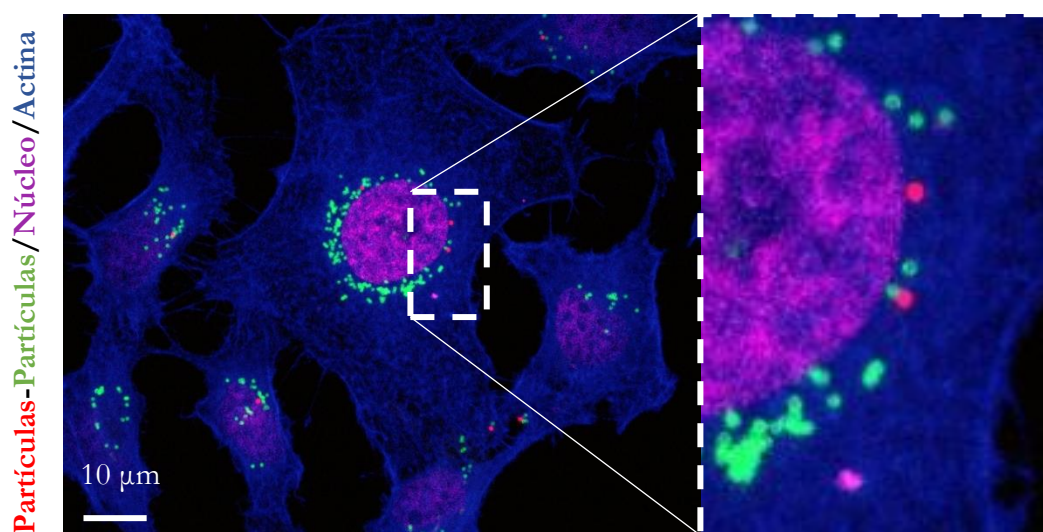


Figura 37. Imagen de microscopía confocal de un co-cultivo de células HeLa donde se muestran células con partículas marcadas con rodamina y fluoresceína, sugiriendo un intercambio de partículas debido a los ciclos de endocitosis-exocitosis.

El segundo experimento consistió en el co-cultivo de células HeLa teñidas en verde (con *cell green*) y células a las que se administraron partículas SiO₂ rojas (**figura 38**). Tras 24 h de co-cultivo, las células se observaron mediante microscopía confocal.

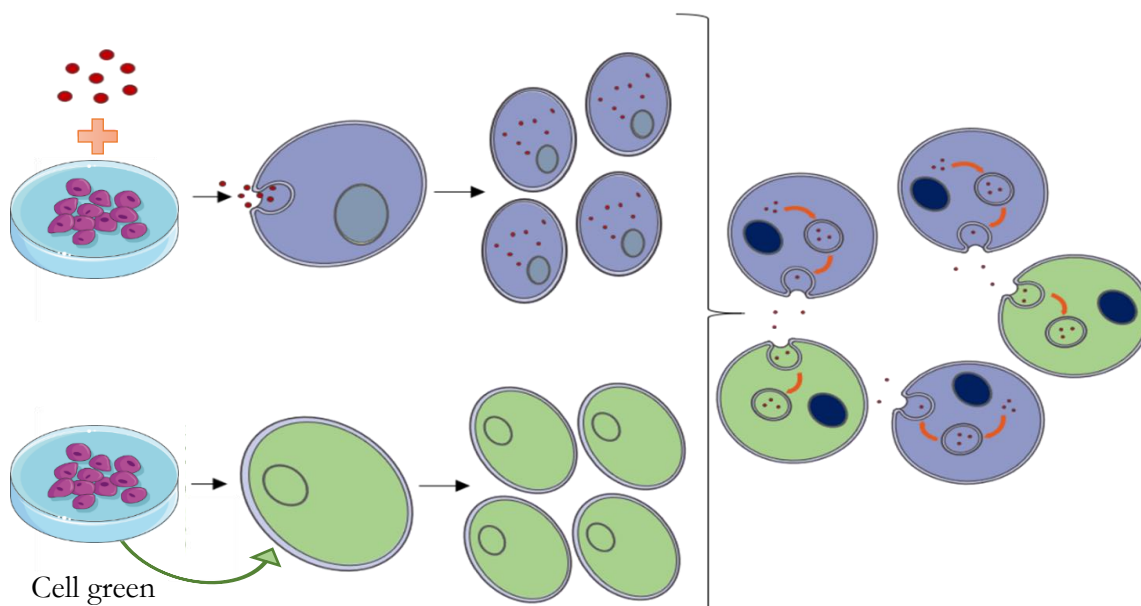


Figura 38. Esquema representando el co-cultivo de células HeLa con partículas teñidas en rojo y células HeLa que han sido teñidas con un colorante verde llamado “cell green”.

Como se muestra en la **figura 39**, este experimento muestra que algunas partículas han podido salir de las células no teñidas y ser re-endocitadas por células cercanas teñidas en verde. Mediante estos experimentos se pudo confirmar que las partículas SiO₂ sufrían ciclos de endocitosis/exocitosis. Este proceso sin embargo, no se observó en las partículas recubiertas con nanotubos de carbono.

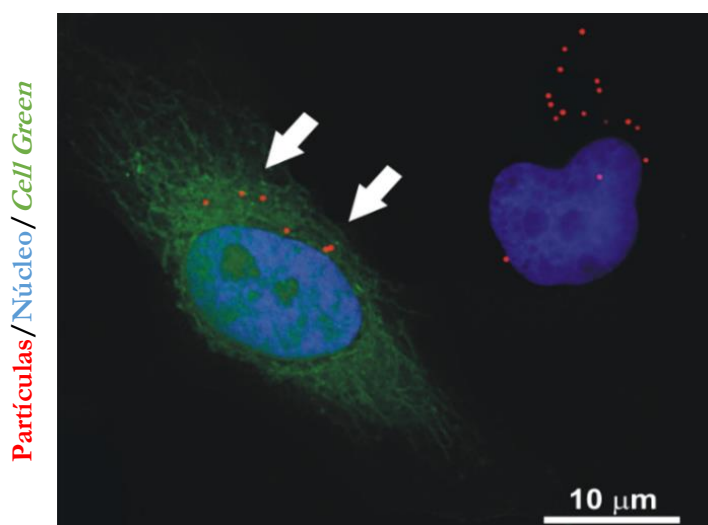


Figura 39. Imagen de microscopía confocal representando un co-cultivo de por un lado células HeLa sin teñir a las que se administraron partículas rojas y, por otro, células HeLa teñidas en verde (sin partículas).

El modelo que se plantea de endocitosis/exocitosis de las partículas aparece resumido en la **figura 40**. Las partículas de sílice funcionalizadas con proteínas séricas entran a las células vía endocitosis. Dentro de los endolisosomas las proteínas de la biocorona se degradan y finalmente las partículas se exocitan. Una vez fuera pueden re-funcionalizarse y volver a entrar dentro de las células. Durante estos ciclos la superficie de la partícula se va modificando por lo que podrían utilizarse para diseñar nanotransportadores aprovechando los procesos de transcitosis, un fenómeno que ocurre en células polarizadas como neuronas, células intestinales, osteoclastos y células endoteliales. En las células polarizadas, la transcitosis unidireccional se refiere al transporte de macromoléculas desde la parte apical hasta la basolateral. Este mecanismo puede resultar especialmente interesante para poder atravesar membranas como la intestinal o la barrera hematoencefálica. El potencial de estas partículas es muy alto debido a la capacidad que tienen de atravesar membranas y llegar al citoplasma.

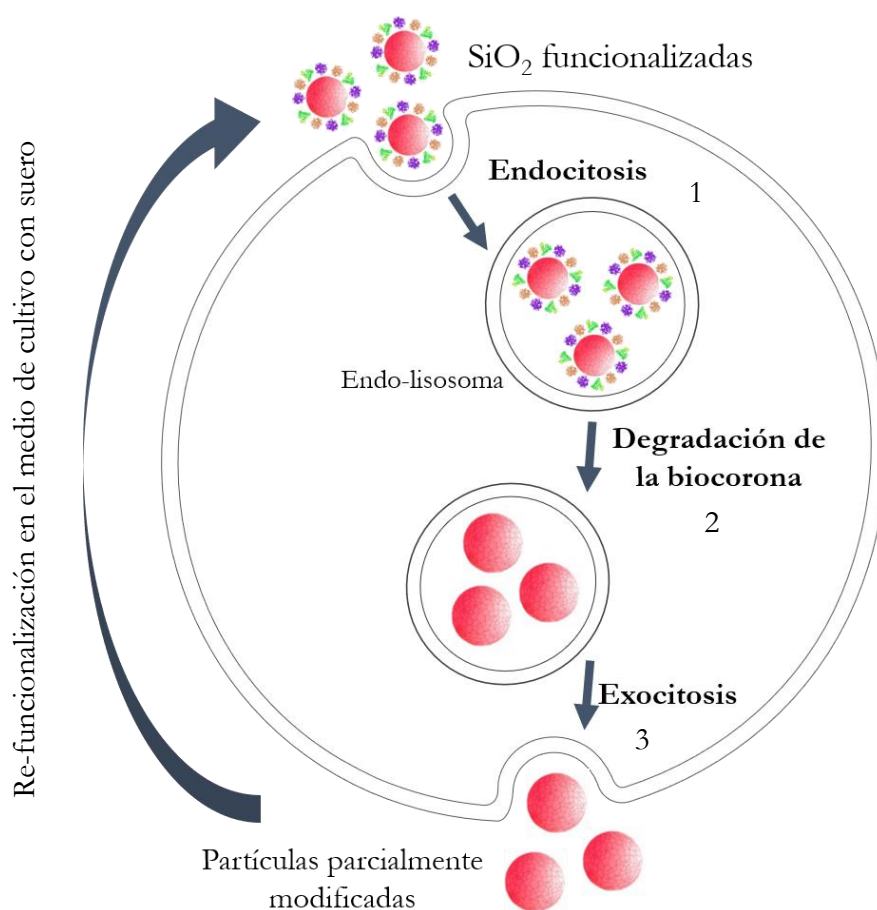


Figura 40. Esquema del modelo propuesto de transcitosis. Las partículas funcionalizadas de SiO_2 entran mediante endocitosis mediada por receptores. En la ruta endolisosomal las proteínas de la biocorona se degradan. Las partículas son exocitadas al medio extracelular, donde pueden ser refuncionalizadas con proteínas séricas y sufrir ciclos de endocitosis-exocitosis. Adaptado de (Renero-Lecuna et al, 2019)

5. ENTRADA AL CITOSOL DE LAS PARTÍCULAS SiO₂-CNT

Como hemos descrito en capítulos anteriores, los nanotubos de carbono tienen la propiedad de atravesar membranas biológicas, tejidos y células (Serpell *et al*, 2016). También son capaces de atravesar la membrana endolisosomal (Al-Jamal *et al*, 2011) y salir al citoplasma para allí interactuar con componentes del citosol, como, por ejemplo, los microtúbulos (García-Hevia *et al*, 2014). En base a estos datos, nuestra hipótesis de partida sería que el recubrimiento de los nanotubos de carbono podría proporcionar a las partículas de sílice la capacidad de escapar de la ruta endolisosomal. Con el fin de investigar esta teoría, el siguiente paso que se realizó fue analizar la localización de las partículas SiO₂-CNT a nivel subcelular, para comprobar su posible salida endolisosomal. Se examinaron cortes ultrafinos de células HeLa embebidos en resina, mediante microscopía electrónica de transmisión (**figura 41**).

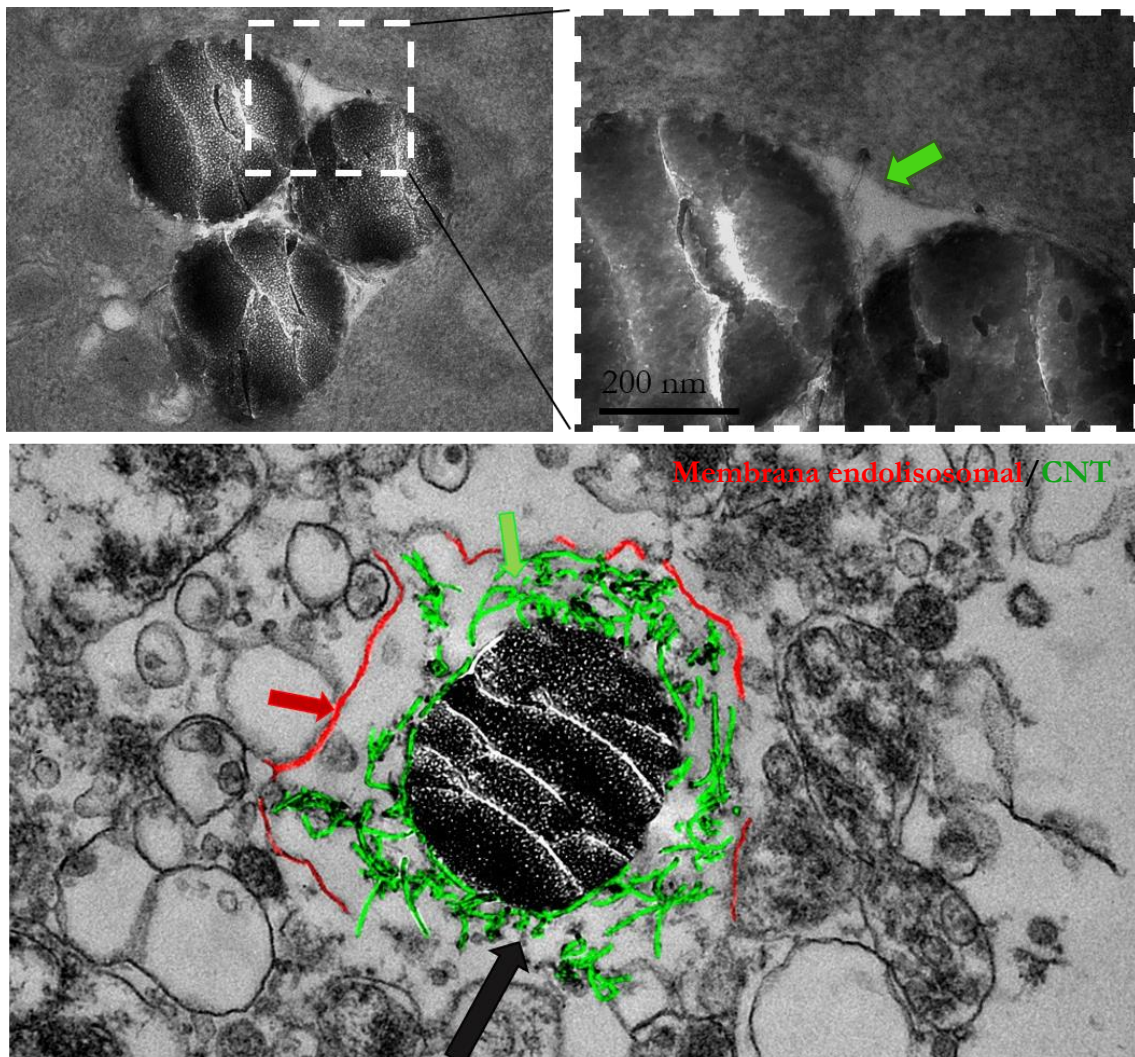


Figura 41. Imágenes de microscopía electrónica de partículas SiO₂-CNT. En las imágenes de la parte superior se observan nanotubos de carbono perforando la membrana endolisosomal. En la imagen de la parte inferior se observa la destrucción de la membrana endolisosomal (rojo).

Estos estudios confirmaron cómo los nanotubos de carbono participan en el escape endolisosomal de las partículas mediante la penetración (**figura 41, arriba, flecha verde**), perforación y permeabilización de la membrana endolisosomal, destruyendo la integridad de la vesícula (**figura 41, abajo, flecha roja**).

Esta salida endolisosomal también se confirmó mediante la microscopía confocal en célula viva (ver **figura 42**). Estos fotogramas muestran cómo partículas que al principio se encontraban en endolisomas ($T=0$) (vesículas moradas), con el paso del tiempo escapan fuera de estas vesículas. En los recuadros de la **figura 42** se muestra paso a paso como una pareja de partículas dentro de un endolisoma vacían el lisosoma de contenido y continuación escapan.

Partículas / LysoTracker® / AO / Partículas endolisomales

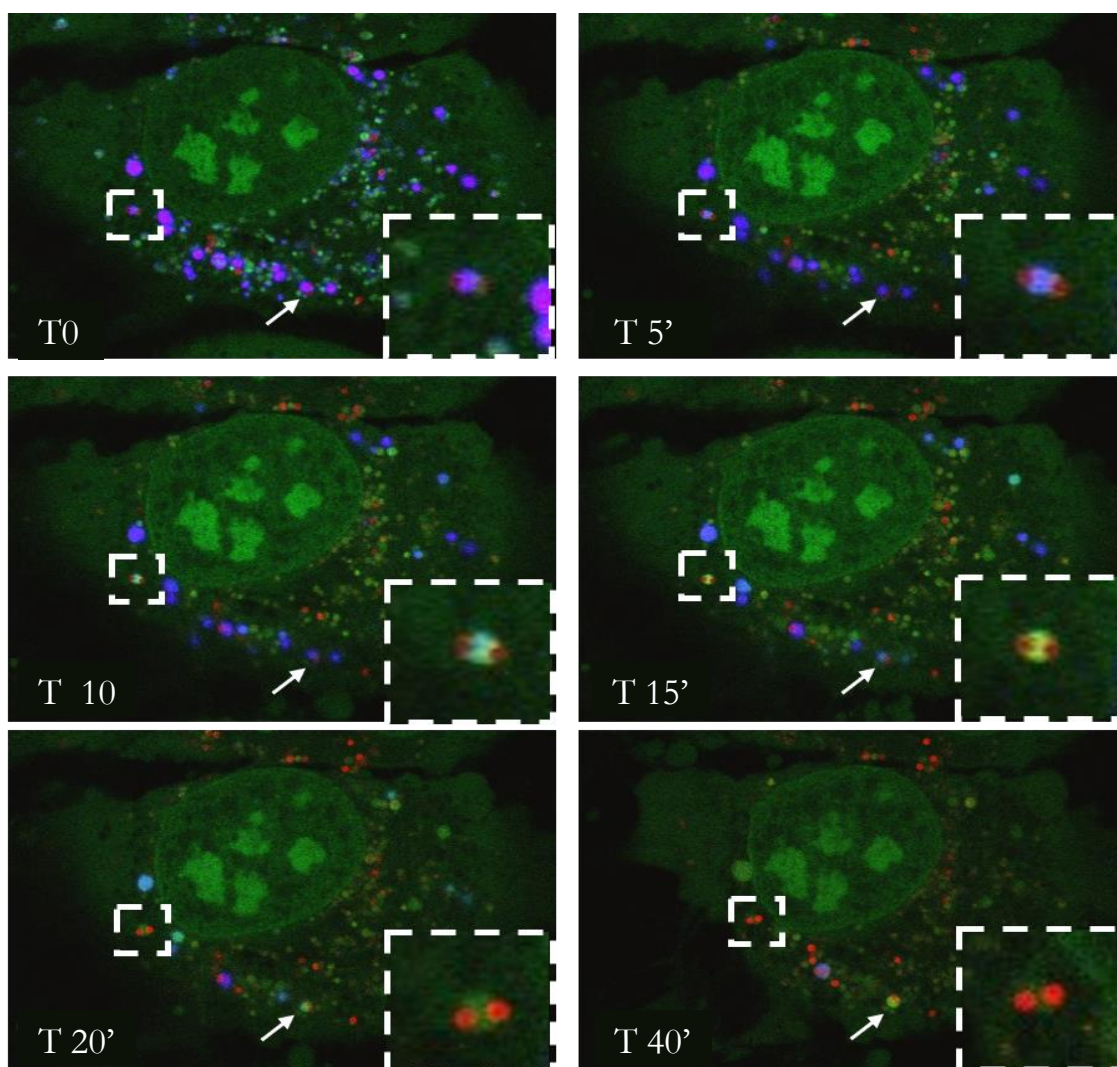


Figura 42. Imágenes de microscopía confocal en células viva. En la imagen a T 0 las partículas se encuentran dentro de las vesículas endolisomales. En la imagen a T 10 las vesículas endolisomales se están vaciando y en la imagen a T 40 las dos partículas se están escapando de los endolisomas.

El modelo del sistema de escape que se plantea lo hemos basado en el método de escape que presentan muchos virus que, aprovechando el ambiente reductor de los lisosomas despliegan proteínas de su cápside exponiendo residuos apolares que interaccionan con las membranas del endolisosoma. En nuestro sistema, las partículas entran mediante endocitosis mediada por receptores debido a la funcionalización con proteínas séricas. Dentro del sistema endolisosomal esta biocorona se degrada, quedando descubierta la superficie de los nanotubos. Las propiedades de la superficie de los nanotubos, fundamentalmente sus características apolares, hacen que aumente la afinidad de estos filamentos por las membranas lipídicas de los endolisosomas, atravesándolas y desencadenando así la liberación de las partículas al citosol, como ocurre con las proteínas de la cápside de algunos virus (Iturrioz-Rodriguez *et al*, 2017) (figura 43).

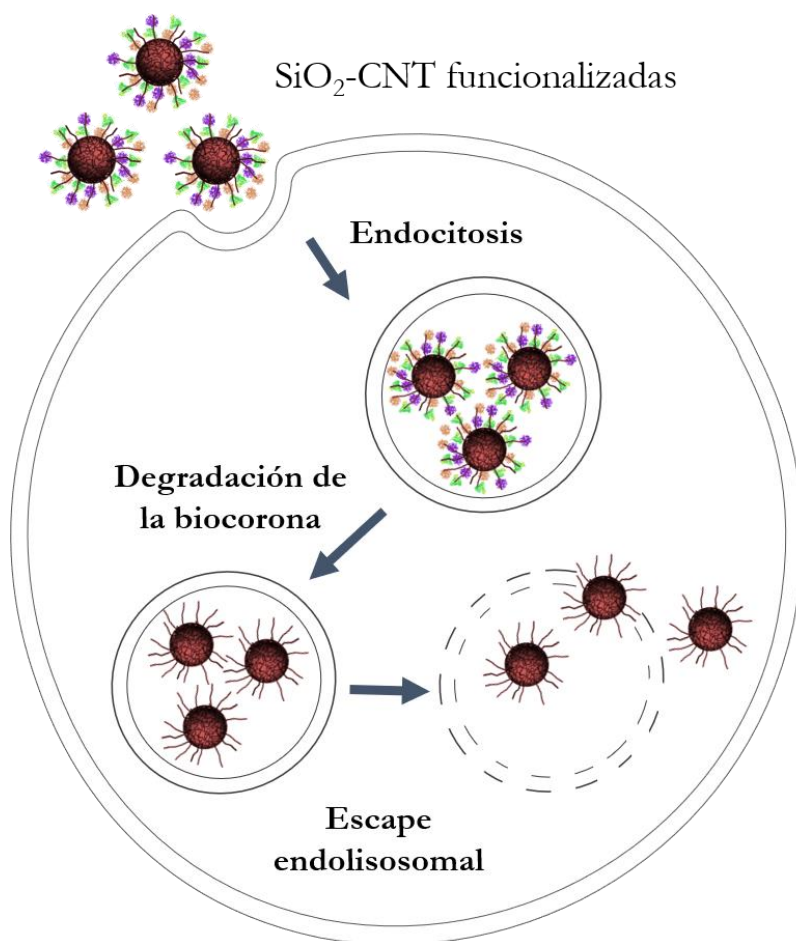


Figura 43. Esquema resumen del recorrido de las partículas de SiO₂-CNT tras su funcionalización con proteínas séricas. Las partículas entran a las células mediante endocitosis. Después la degradación de la biocorona en las vesículas endolisomales, las zonas apolares de los nanotubos de carbono quedan expuestas, interaccionando con la membrana endolisosomal, permeabilizándola, y liberando las partículas al citosol. Adaptada de (Reniero-Lecuna *et al*, 2019)

Para poder estudiar esta hipótesis en colaboración con el Dr Correa-Duarte y la Dra González-Lavado se unió un colorante (5-TAMRA) de manera covalente, mediante un enlace disulfuro, a la cubierta de los nanotubos de carbono. Este enlace es muy interesante desde el punto de vista biológico ya que se encuentra en las proteínas, estabilizando su estructura terciaria, en la unión de dos cisteínas. Además, es sensible al medio reductor presente en el sistema endolisosomal y también existen enzimas citoplasmáticas encargadas de su ruptura, como es el caso de la proteína disulfuro-isomerasa (PDI) (Galligan & Petersen, 2012). De esta forma, si no se separara todo el colorante de la superficie del nanotubo en el interior de los endolisomas, esta ruptura podría tener lugar finalmente en el citoplasma. Este enlace también es fácilmente reducido a grupos tioles *in vitro* mediante agentes reductores como por ejemplo el 2-mercaptoetanol.

Las partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ con el 5-TAMRA se funcionalizarán y se administrarán a cultivos celulares para que cuando entren en la vía endolisosomal, las proteínas se degraden dejando el colorante expuesto. Las condiciones reductoras de los endolisomas romperán el enlace disulfuro, liberando el colorante y dejarán expuestas las zonas apolares de los nanotubos de carbono. Los nanotubos de carbono romperán la membrana endolisosomal y de esta manera el colorante se liberará al citoplasma como se representa en la **figura 44**.

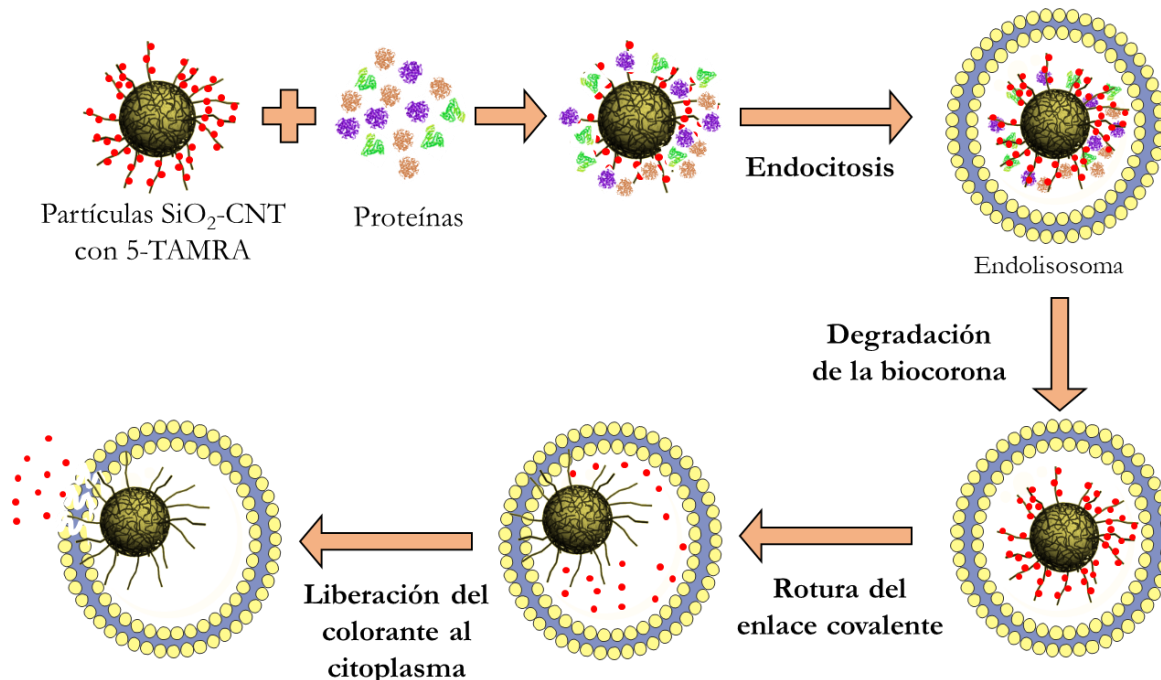


Figura 44. Diagrama donde se esquematiza la posible liberación del colorante unido a los nanotubos de carbono mediante un enlace disulfuro. Las partículas funcionalizadas entran a las células vía endocitosis. La biocorona se degrada en los endolisomas dejando expuesto el enlace disulfuro. Las condiciones reductoras del ambiente rompen el enlace. La superficie apolar de los nanotubos de carbono rompe la membrana de los endolisomas y el colorante sale al citoplasma.

Como es característico para los nanotubos de carbono, cuando un fluoróforo se encuentra unido a su superficie, la emisión de fluorescencia desaparece debido a un fenómeno conocido como “*quenching*”, resultado de un proceso de transferencia de carga en el que el electrón excitado del fluoróforo se transfiere al nanotubo. Por eso, cuando analizamos la liberación del colorante mediante espectroscopía *in vitro* (**figura 45, banda negra**), no se observó la emisión de los nanotubos de carbono funcionalizados con 5-TAMRA. Sin embargo cuando los nanotubos de carbono ligados a las partículas se exponen a 500 μ L de 2-mercaptoetanol, la intensidad de emisión de fluorescencia del 5-TAMRA pasó a ser detectable en el medio (**figura 45, banda roja**), debido a la separación del colorante de la superficie del nanotubo.

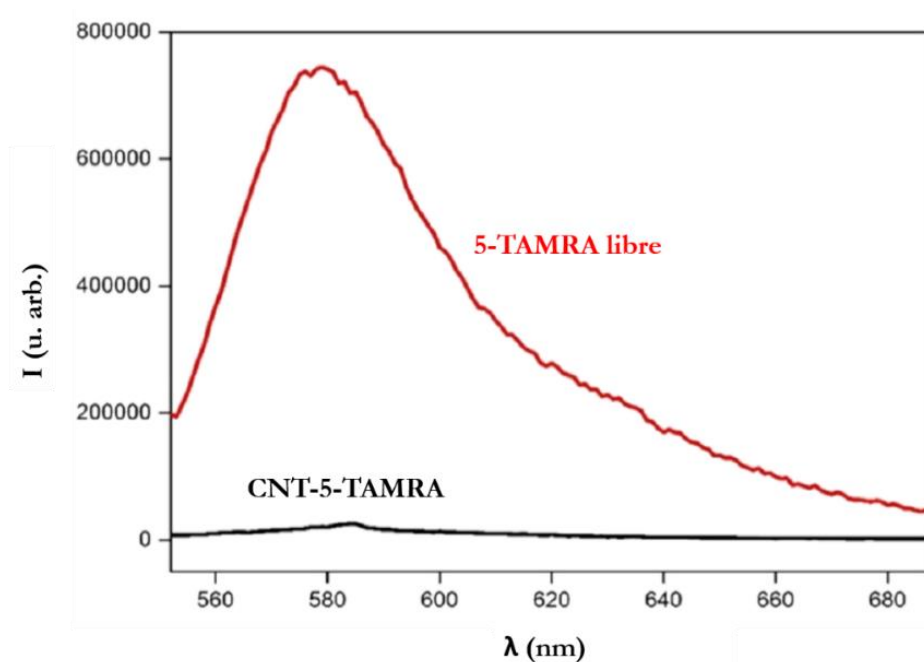


Figura 45. Ensayo de liberación del 5-TAMRA *in vitro*. En negro se observa el espectro de emisión de fluorescencia de los nanotubos y el colorante. En rojo se observa el espectro de emisión de fluorescencia de los nanotubos y el 5-TAMRA una vez expuestos al agente reductor 2-mercaptoetanol y tras su liberación. $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$.

Una vez demostrado que el 5-TAMRA se liberaba de los nanotubos de carbono en condiciones reductoras, se quiso confirmar la hipótesis anterior. Para ello, se observaron a microscopía confocal células HeLa expuestas a las partículas SiO₂-CNT-5-TAMRA. Como se observa en la **figura 46** tras 2 h de exposición no se detecta fluorescencia del colorante 5-TAMRA, por lo que no ha sido liberado. No obstante, tras 24 h de incubación, se demuestra la liberación del colorante en el citoplasma, indicando la degradación de las proteínas de la biocorona tal y como hipotetizamos en el modelo descrito en la **figura 44**.

SiO₂-CNT-5TAMRA / Núcleos / 5-TAMRA

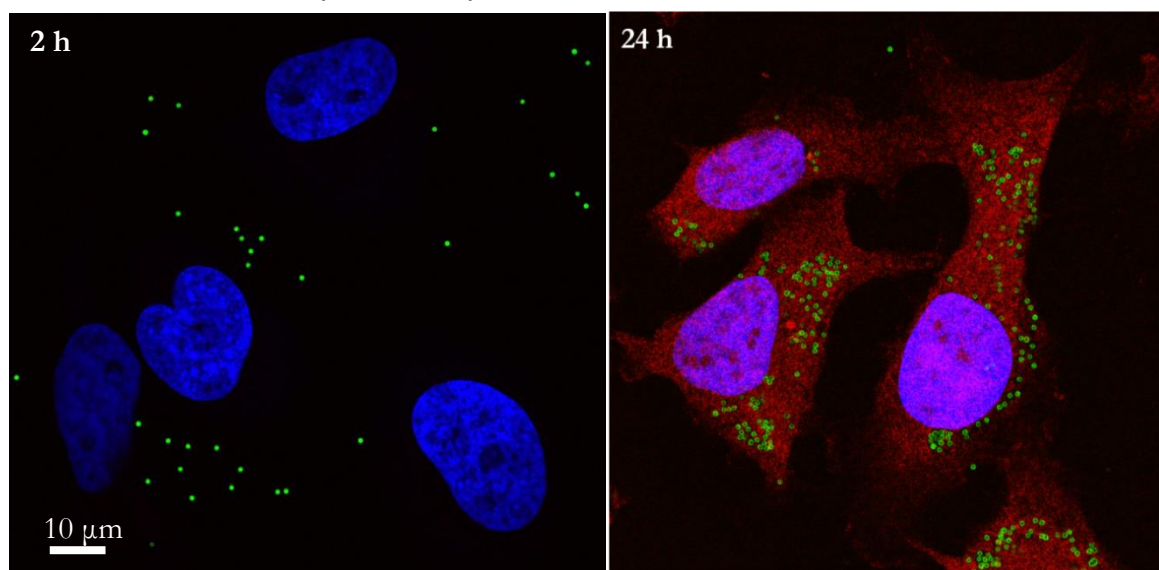


Figura 46. Ensayo de liberación del 5-TAMRA a partir de partículas de SiO₂ con nanotubos de carbono. Células HeLa tras dos horas de administración de las partículas (en verde) a la izquierda, y liberación citoplasmática del colorante en células HeLa tras 24 h de la administración de las partículas.

Como se demostró previamente, los nanotubos de carbono favorecen la entrada de las partículas SiO₂ en el sistema endolisosomal donde la biocorona se degrada dejando expuesta la superficie de los nanotubos de carbono. Ésta interacciona con los lípidos de las membranas de las vesículas provocando su perforación, permeabilización y en última instancia, la liberación de las partículas SiO₂-CNT al citosol.

Este estudio muestra cómo la corona de nanotubos de carbono podría ser de gran utilidad para preservar la integridad de terapias sensibles a las condiciones hostiles del lisosoma, como su bajo pH o ambiente reductor. Los nanotubos de carbono prevendrían la permanencia de la terapia dentro del lisosoma, favoreciendo su salida al citosol.

6. CITOTOXICIDAD DE LAS PARTÍCULAS CON CNT

Como se ha hecho referencia a lo largo de los diferentes capítulos de esta tesis, trabajos anteriores de este laboratorio han demostrado que los nanotubos de carbono pueden desencadenar la muerte celular a concentraciones de entre 20-100 $\mu\text{g/mL}$ dependiendo del tipo celular (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012; García-Hevia *et al*, 2015a), desorganizando el citoesqueleto microtubular que pierde su organización centrosomal radial y los microfilamentos de la corteza de actina. Dado que este fenotipo se investigó principalmente con nanotubos de carbono prístinos, en este estudio primero se miramos si eran reproducibles los cambios en las células con nanotubos de carbono oxidado. Tal y como se muestra en la **figura 47**, el tratamiento de las células con nanotubos de carbono oxidados resulta en la pérdida de la organización centrosomal de los microtúbulos (contraste de fase), así como la desorganización de la corteza de actina, tras la administración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de nanotubos de carbono oxidados. Además, la cuantificación de la muerte celular mediante la prueba de exclusión de vivas/muertas con azul tripán reveló que la exposición a nanotubos de carbono dispersos provoca una reducción de un 6.5 % la viabilidad celular durante las primeras 48–72 h de exposición. Por tanto, este estudio con nanotubos de carbono oxidados apoya las observaciones publicadas y corrobora la hipótesis

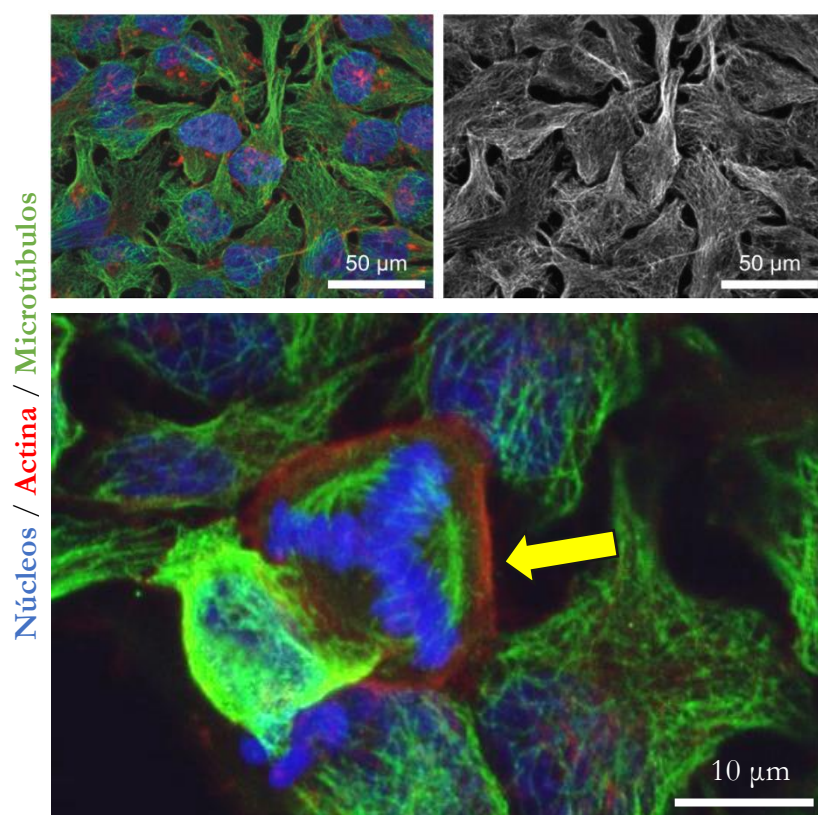


Figura 47. Imágenes de microscopía confocal y contraste de fase de células tratadas con nanotubos de carbono oxidados durante 72 h. Imágenes donde se observa la desorganización centrosomal (arriba), e imagen donde se observan aberraciones en la organización del uso mitótico (tripolar) (abajo, flecha amarilla).

de la interacción biomimética entre los nanotubos de carbono y los microtúbulos (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012; García-Hevia *et al*, 2015a; González-Domínguez *et al*, 2017).

La citotoxicidad de los nanotubos de carbono oxidados unidos a las partículas de sílice y de las propias partículas se estudió realizando diferentes ensayos: azul de tripán para estudiar la viabilidad, citometría de flujo para estudiar la viabilidad y los cambios del ciclo celular, y finalmente, estudios de estrés oxidativo donde se midió la cantidad de ROS, como los peróxidos de hidrógeno, radicales hidroxilo y peroxinitrito. Para poder comparar la toxicidad de los nanotubos de carbono dispersados frente a la de los unidos a las partículas, se calcularon cantidades de nanotubos de carbono que contenían las partículas de SiO₂-CNT y se emplearon concentraciones similares a los de nanotubos de carbono resuspendidos en medio de cultivo (100 µg/mL) y empleados como control positivo en los estudios morfológicos realizados con microscopía confocal. Se observó que las células tratadas con partículas SiO₂-CNT presentaban un citoesqueleto bien organizado, con un centrosoma visible (**figura 48, flechas blancas**) y microfilamentos de actina no reactivos en la corteza celular a pesar del gran número de partículas existentes por célula (>100 partículas/célula) (**figura 48, flechas rojas**).

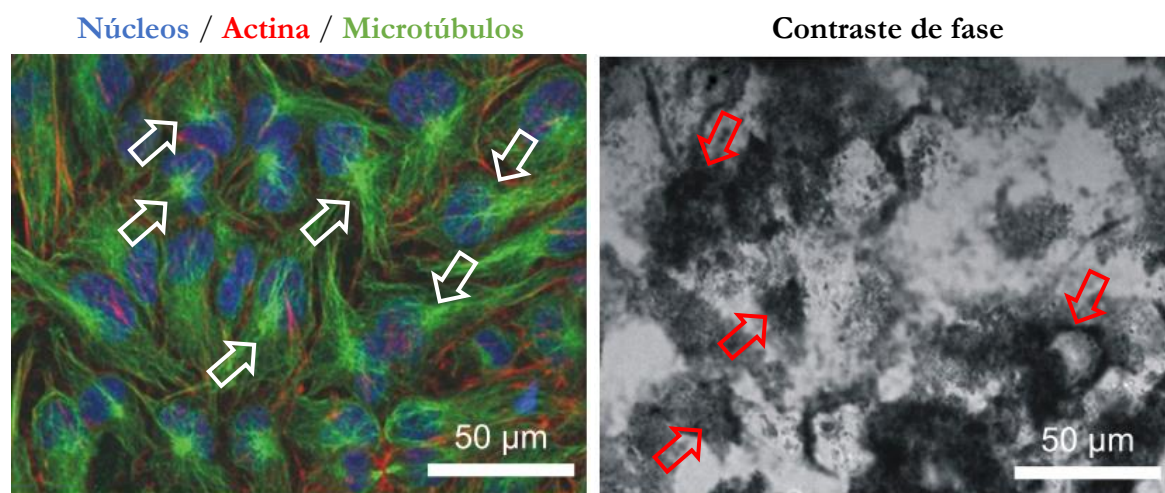


Figura 48. Imágenes de microscopía confocal y de contraste de fase de los nanofilamentos intracelulares en células interfásicas tratadas con partículas SiO₂-CNT durante 72 h. En la imagen de la izquierda se señalizan los centrosomas con flechas blancas. En la imagen de la derecha, las zonas negras corresponden a los nanotubos de carbono de las partículas SiO₂-CNT (flechas rojas).

Por otro lado, la tasa de supervivencia de las células (necrosis y apoptosis por azul de tripán y citometría, respectivamente) expuestas a partículas SiO₂ y a SiO₂-CNT no indicaba diferencias significativas con respecto a las células control sin tratar (ver **figura 49**).

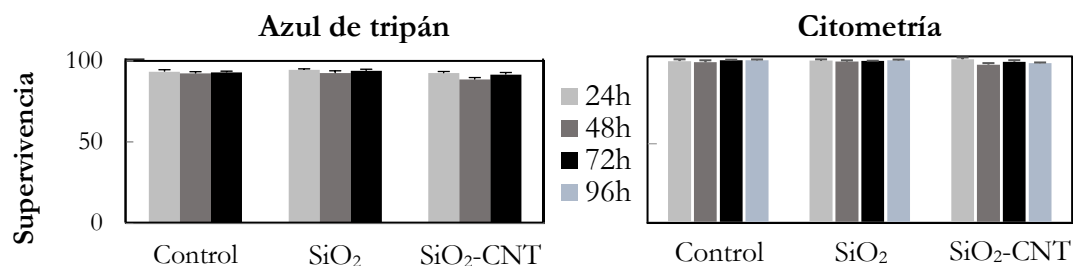


Figura 49. Porcentaje de viabilidad de células HeLa control (sin tratar), con partículas SiO₂ y SiO₂-CNT. Determinación por ensayos de azul de tripán (izquierda) y citometría de flujo (derecha) de la necrosis y apoptosis en células HeLa.

Dado que los nanotubos de carbono interactúan con los microtúbulos provocando la inhibición de su dinámica y generando un bloqueo en S-G2 (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012; Dinicola *et al*, 2015; García-Hevia *et al*, 2014), también estudiamos el efecto que podrían tener las partículas en el ciclo celular. Para ello, se analizó, mediante citometría de flujo, el ciclo celular en células control, células tratadas con los dos tipos de partículas y con nanotubos de carbono dispersos para analizar si los nanotubos de carbono unidos a las partículas mantenían o perdían su efecto citotóxico. Como se muestra en la **figura 46**, los ciclos celulares de las células control y las células a las que se habían administrado los dos tipos de partículas presentan un ciclo celular similar. Las células tratadas con nanotubos de carbono resuspendidos presentaban un aumento de las fases S-G2, siendo este aumento proporcional a la concentración de nanotubos (García-Hevia *et al*, 2015b; González-Lavado *et al*, 2018),

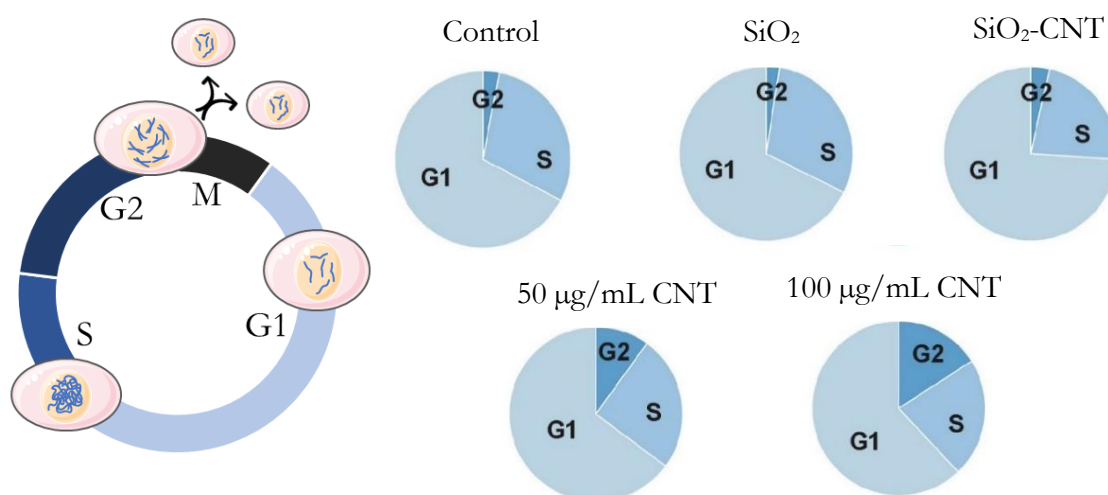


Figura 50. Esquema del ciclo celular con las diferentes fases: G1, S y G2. Diagramas circulares de las diferentes fases del ciclo celular tras 72 h de administración de las diferentes partículas y nanotubos de carbono oxidados (a diferentes concentraciones: 50 y 100 µg/mL).

Por último, y dado que en la bibliografía se ha descrito que los nanotubos de carbono generan estrés oxidativo (Sun *et al*, 2015; Rubio *et al*, 2016; Cano *et al*, 2017), quisimos estudiar si los nanotubos de carbono unidos a las partículas generaban ese mismo efecto 72 h después de su administración. Como se puede apreciar en la **figura 47**, no hay diferencias significativas en el porcentaje de estrés oxidativo tras el suministro de partículas con nanotubos de carbono.

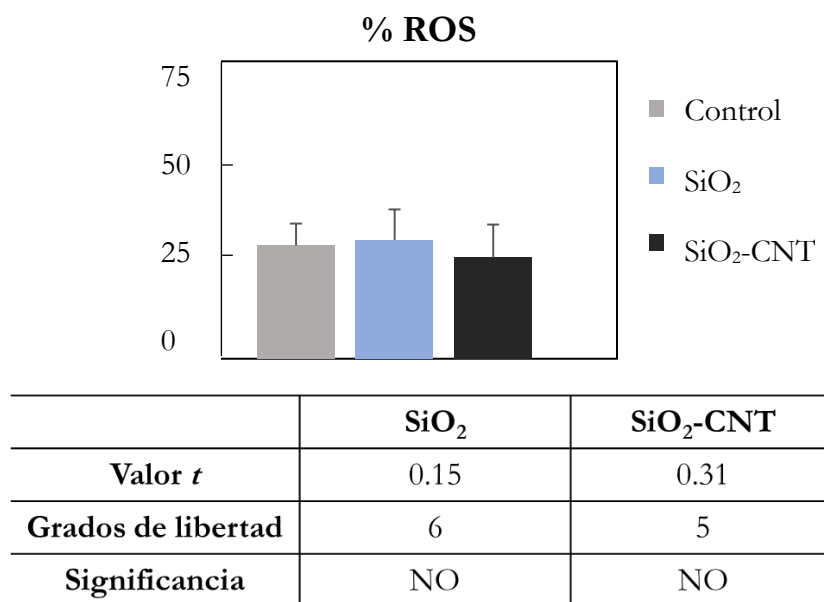


Figura 51. (Arriba) Histograma representando el porcentaje de especies reactivas de oxígeno en células control, y células con partículas SiO₂ y SiO₂-CNT tras 72 h de su administración. No hay diferencias significativas entre las muestras. Como control positivo se midieron células tratadas con 100 μ M de H₂O₂. (Abajo), tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

Estos experimentos de citotoxicidad demuestran por primera vez cómo la simple presencia de nanotubos de carbono en células no es suficiente para desencadenar su citotoxicidad intrínseca, y cómo la muerte celular que provocan se debe principalmente a la interacción de los nanotubos de carbono dispersos con los microtúbulos. Estos experimentos apoyan la idea de que los nanotubos individualizados pueden interactuar libremente con los filamentos celulares, como la actina, el ADN y los microtúbulos, desencadenando efectos citotóxicos o genotóxicos letales como los descritos por nuestro grupo de investigación (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012; García-Hevia *et al*, 2015b; González-Lavado *et al*, 2018). Estos resultados indican también que los nanotubos de carbono unidos a las partículas no pueden interferir con la función de los nanofilamentos intracelulares comportándose como agregados, y por lo tanto, resultando inocuos para las mismas células en dosis comparables. La explicación más simple es que los nanotubos dispersos se comportan como nanomateriales, mientras que las SiO₂-CNT se comportan como ovillos de CNT. Este hecho tiene implicaciones críticas en la biología porque

los nanomateriales, y en particular los nanotubos de carbono, muestran superficies altamente reactivas, así como una semejanza morfológica con los elementos del citoesqueleto que favorecen su interacción biomimética, lo que desencadena impedimentos biomecánicos que conducen a la muerte celular (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012; García-Hevia *et al*, 2014). Cuando los nanotubos de carbono se unen a las partículas de sílice, estos nanofilamentos no interactúan con el citoesqueleto celular y se comportan más como materiales particulados volviéndose más biocompatibles (González-Domínguez *et al*, 2017) (**figura 52**).

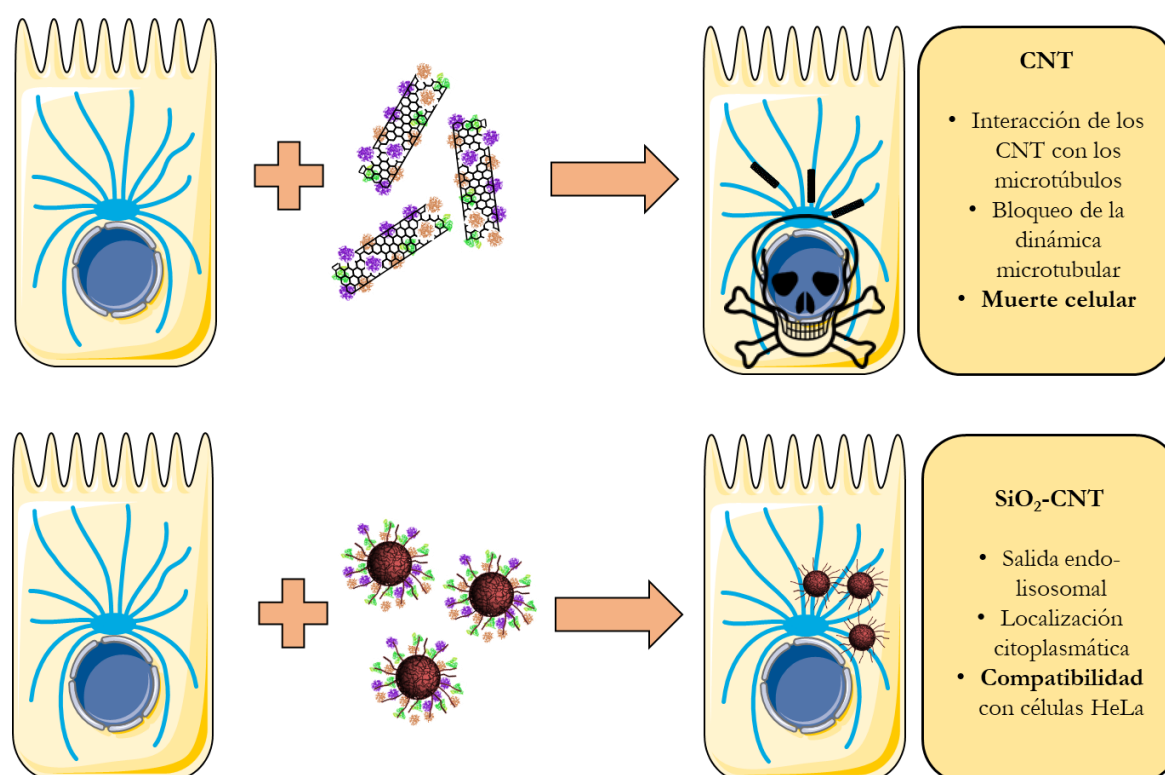


Figura 52. Esquemas representando la interacción de los nanomateriales con las células. (Arriba) la interacción de los nanotubos de carbono con los microtúbulos, provocando citotoxicidad, y (abajo) la interacción de las partículas SiO₂-CNT con una célula y cómo las partículas escapan de la vía endo-lisosomal de forma progresiva sin generar citotoxicidad.

Tras observar que los nanotubos de carbono unidos a las partículas no eran citotóxicos investigamos la posibilidad de su liberación programada de las partículas para desencadenar efectos terapeuticos. Para ello, se unieron los nanotubos de carbono a la sílice mediante un tipo de polielectrolito biodegradable (PED), de tal manera que se pudiera analizar la citotoxicidad de dichos nanotubos una vez sueltos. Tras la administración de estas partículas (SiO₂-CNT-PED), se estudiaron sus efectos empleando técnicas de microscopía confocal, microscopía electrónica y citometría de flujo.

Como se puede apreciar en la **figura 53** el ciclo celular de las células HeLa tras 72 h de incubación con las partículas SiO₂-CNT-PED no presenta diferencias con respecto a las células control, además en la imagen de microscopía confocal no se observan aberraciones mitóticas y la red microtubular es normal.

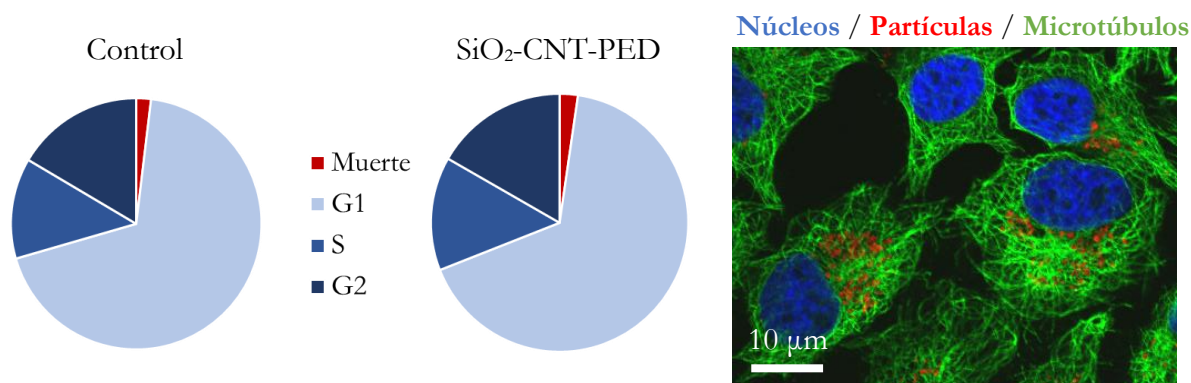


Figura 53. Toxicidad en partículas SiO₂-CNT con polielectrolito degradable. Diagramas circulares donde se observan las diferentes fases del ciclo celular y la apoptosis (muerte) de células control y células con partículas SiO₂-CNT-PED tras 72 h de su administración (izquierda). Imágenes de microscopía confocal donde se observan células HeLa tras 72 h de la administración de las partículas (derecha),

El análisis a nivel subcelular empleado revelaba cómo los nanotubos de carbono liberados de las partículas formaban ovillos (**figura 54**) que no parecían interaccionar con los microtúbulos, concluyéndose que esta agregación de los nanotubos resultaba en la pérdida de biomimética con lo microtúbulos y *por ende*, pérdida de su capacidad de interferir con su dinámica.

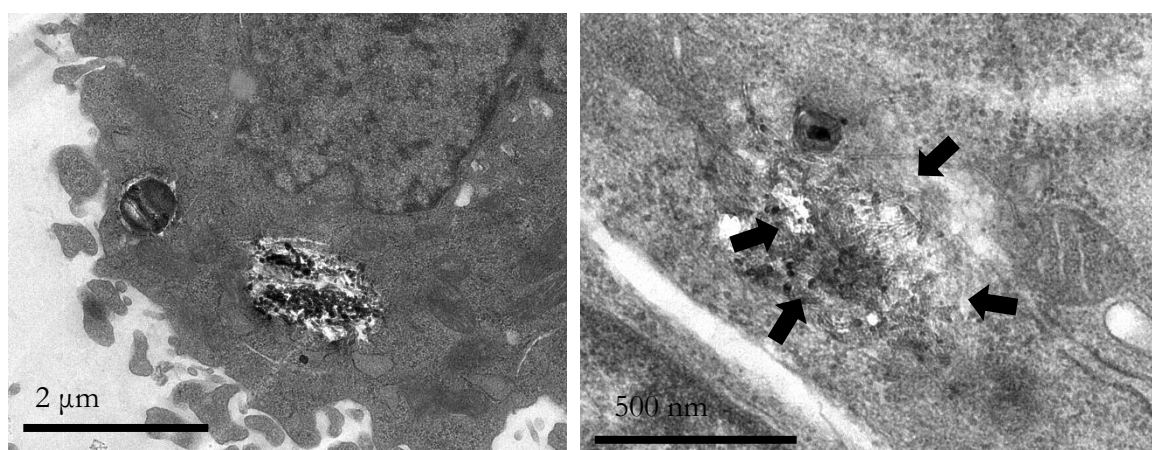


Figura 54. Imágenes de microscopía electrónica donde se observan nanotubos de carbono (flechas negras) en célula HeLa tras 72 h de su administración.

En la **figura 55** se muestra a modo resumen el modelo de interacción de las partículas SiO₂-CNT-PED que se propone. Cuando el polielectrolito se degrada en el interior celular, la cubierta de nanotubos de carbono se libera al citoplasma en forma de ovillo. Esta morfología no permite que los nanotubos de carbono interactúen con los microtúbulos, por lo que, no parecen desencadenar efectos citotóxicos. Las partículas de SiO₂ sin recubrimientos podrían sufrir ciclos de endocitosis-exocitosis de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

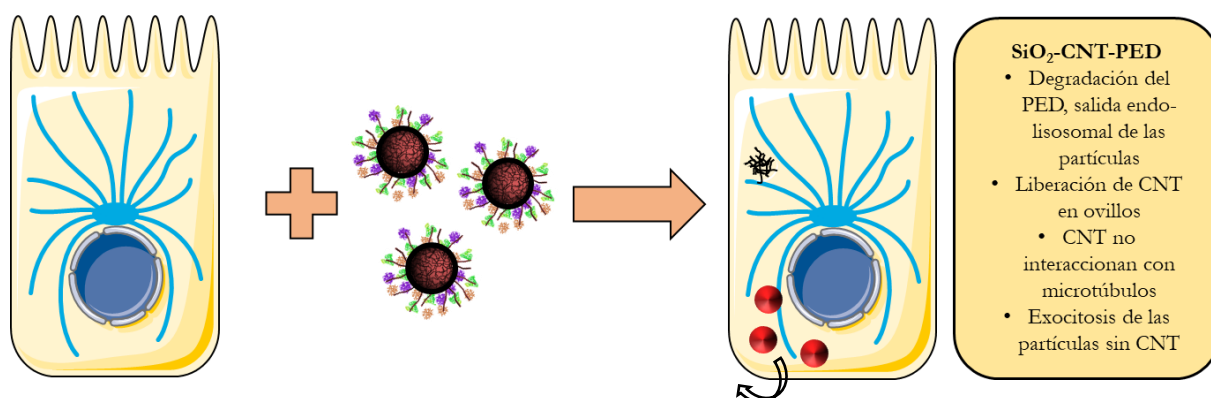


Figura 55. Modelo de interacción y procesamiento intracelular de las partículas SiO₂-CNT con un polielectrolito degradable. La degradación intracelular del polielectrolito libera los nanotubos de carbono al citoplasma en forma de ovillo. Las partículas de sílice sin recubrimientos son exocitadas.

Estos hallazgos que demuestran que los nanotubos de carbono unidos entre sí mediante un polielectrolito degradable no sean citotóxicos, los hace muy interesantes en el diseño de recubrimientos para diferentes nanomateriales y conseguir que dichas estructuras escapen de la membrana endolisosomal de una manera compatible para célula.

7. LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS CON CNT NO DISMINUYEN EL TAMAÑO TUMORAL

Trabajos anteriores del laboratorio revelaron que una única inyección intratumoral de 2 µg de nanotubos de carbono produce efectos antitumorales notables *in vivo*, dando lugar a masas tumorales un 27 % más pequeñas que las observadas en los controles no tratados (García-Hevia *et al*, 2016c). Dado que estas partículas que hemos diseñado liberan los nanotubos de carbono, nos planteamos estudiar si éste hecho podría interferir en el crecimiento tumoral como se observó anteriormente con los nanotubos de carbono dispersos

Para investigar esta hipótesis, se utilizaron partículas de sílice con y sin el recubrimiento de nanotubos de carbono (como se describe en el apartado de materiales y métodos). La unión de

los nanotubos a las partículas se realizó con el polielectrolito degradable para comprobar si los nanotubos liberados presentaban algún efecto antitumoral. De esta manera, se trasplantaron células melanocíticas de la línea murina B16F10 (García-Hevia *et al*, 2016a) (ver materiales y métodos apartado 3.5) y se dejó que estas células crecieran durante 7 días en ratones neonatos. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño óptimo se llevó a cabo una única inyección de 8 μg de ambos tipos de partículas. Al cabo de 4 días, se diseccionaron los tumores y se llevó a cabo una evaluación de los cambios producidos en sus masas.

Como se observa en la **figura 56** no hay diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los tumores tras la administración de las partículas. Esto refuerza la hipótesis de que los nanotubos de carbono unidos a las partículas no generan toxicidad cuando se liberan de las partículas en forma de racimos. Además, estos estudios preliminares podrían ser utilizados como controles para estudios futuros de encapsulación de fármacos antitumorales en partículas de sílice.

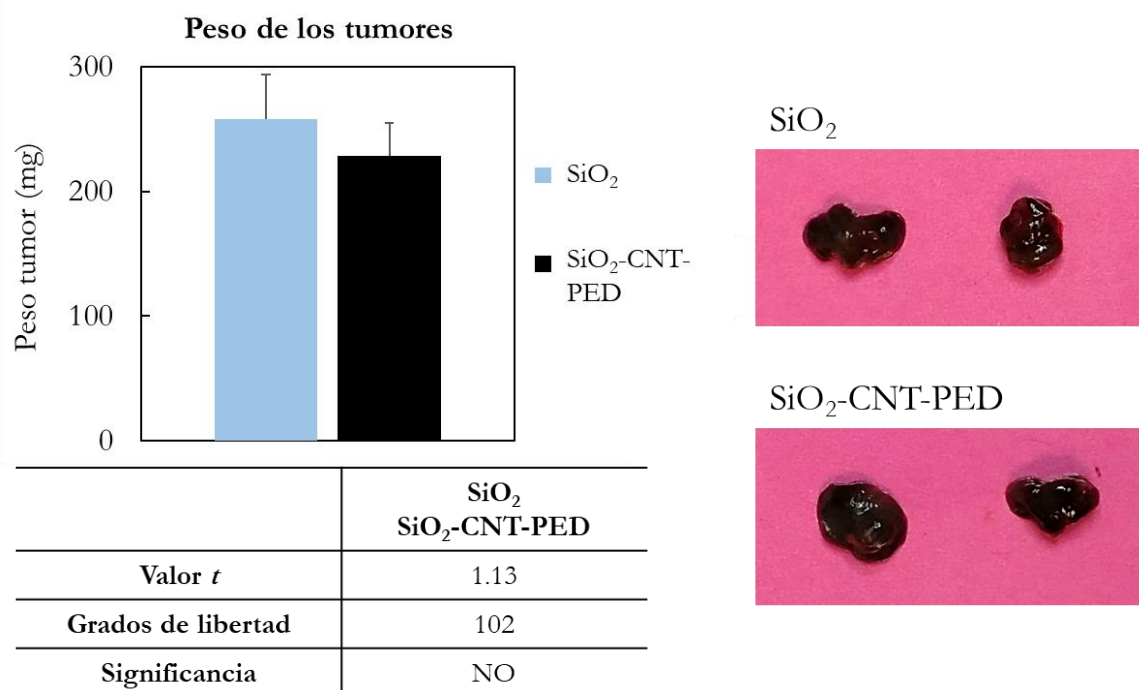


Figura 56. Evaluación del posible efecto tóxico de las partículas recubiertas con y sin nanotubos de carbono. (Izquierda) Diagrama de barras donde se representa el tamaño de los tumores después de 4 días tras la inyección, y la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia y (derecha) Imágenes representativas de los tumores tras la inyección de 8 μg de partículas SiO₂ y SiO₂-CNT-PED.

8. BIODEGRADABILIDAD DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE

La “biodegradación” y eliminación de los nanomateriales es un requisito importante cuando se quiere aplicar un nanomaterial en el mundo biomédico (Croissant *et al*, 2017). Muchos tipos de nanopartículas no son degradables en ambientes biológicos, pero sí son eliminados debido a su pequeño tamaño por debajo del umbral típico de 5.5 nm, que corresponde con el tamaño típico de eliminación renal (Choi *et al*, 2007; Liu *et al*, 2013b; Burns *et al*, 2009). Sin embargo, las nanopartículas con tamaños superiores a 10 nm o compuestas de metales pesados son absorbidas rápida y eficientemente por el hígado y el bazo (el sistema reticuloendotelial), generando problemas de toxicidad a largo plazo (Ehlerding *et al*, 2016). Por ello, se han estudiado nanopartículas más grandes con capacidad de ser degradadas para combinar diferentes aplicaciones como la obtención de imágenes (Fatiev *et al*, 2015; Gogoi *et al*, 2016), la administración de fármacos o genes (Bastakoti & Liu, 2017; Song *et al*, 2017; Vangijzegem *et al*, 2019), y la terapia fotodinámica (Riley & Day, 2017; Ke *et al*, 2011; Wu & Zhou, 2015), entre otras. Sin embargo, la mayoría de las nanopartículas inorgánicas o no son biodegradables, o si lo son, sus productos de degradación resultan ser tóxicos. Entre las nanopartículas de óxidos de metal, los óxidos de zinc y cobre, por ejemplo, liberan iones tóxicos de zinc y cobre (Wang *et al*, 2016; García-Hevia *et al*, 2016b) que pueden ser nocivos tanto para humanos como para el medio ambiente (Djuris *et al*, 2014; Bystrzejewska-piotrowska *et al*, 2009). La acumulación de nanopartículas inorgánicas y/o la liberación resultante de iones, por tanto, es un problema importante cuando se quiere usar la nanotecnología para aplicaciones biomédicas. No obstante, también existen nanopartículas inorgánicas degradables como las de fosfato de calcio (Gao *et al*, Tang *et al*, 2014), fosfato de manganeso (Bhakta *et al*, 2005; Hao *et al*, 2017), silicio (Si) (Hao *et al*, 2012; Zhai *et al*, 2012; Vallet-Regí *et al*, 2018; Chen *et al*, 2015a) y nanopartículas de óxido de hierro de pequeño tamaño (5-7 nm) (Ehlerding *et al*, 2016).

Como parte de esta tesis he trabajado en la biocompatibilización de los nanotubos de carbono mediante tratamientos de oxidación, lo que favorece su biodegradación *in vitro* e *in vivo* intratumoral y peritumoralmente (González-Lavado *et al*, 2018). Una vez conseguido este objetivo, nos centramos en estudiar la degradación de las partículas de sílice. Para favorecer la degradación de nuestro sistema tanto *in vitro* (en PBS y medio lisosomal sintético) como *in vivo* (macrófagos y HeLa), se recubrieron con nanotubos de carbono oxidados partículas de sílice mesoporosa. Este tipo de sílice presenta un tamaño fácilmente modificable, una estructura porosa y una gran superficie que, como ocurre con los nanotubos de carbono oxidados podría favorecer los fenómenos degradativos (Vogt *et al*, 2010; Slowing *et al*, 2007; Bharti *et al*, 2015; Maleki & Hamidi, 2016). Para algunos de los apartados del estudio, las partículas de sílice

mesoporosa se recubrieron con varios polielectrolitos, algunas con nanotubos de carbono y se investigaron las velocidades de degradación y posterior liberación del contenido transportado *in vitro*.

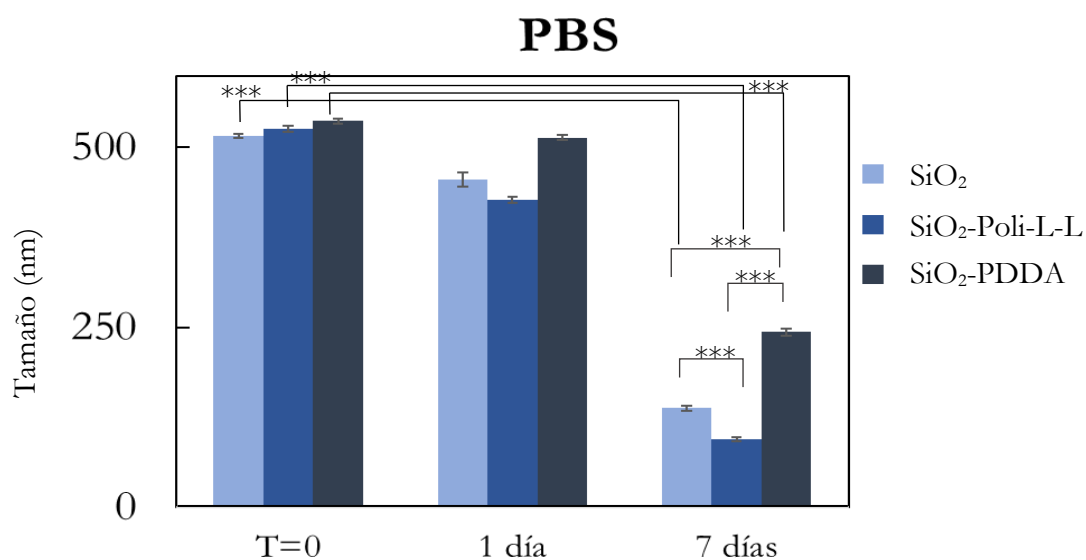
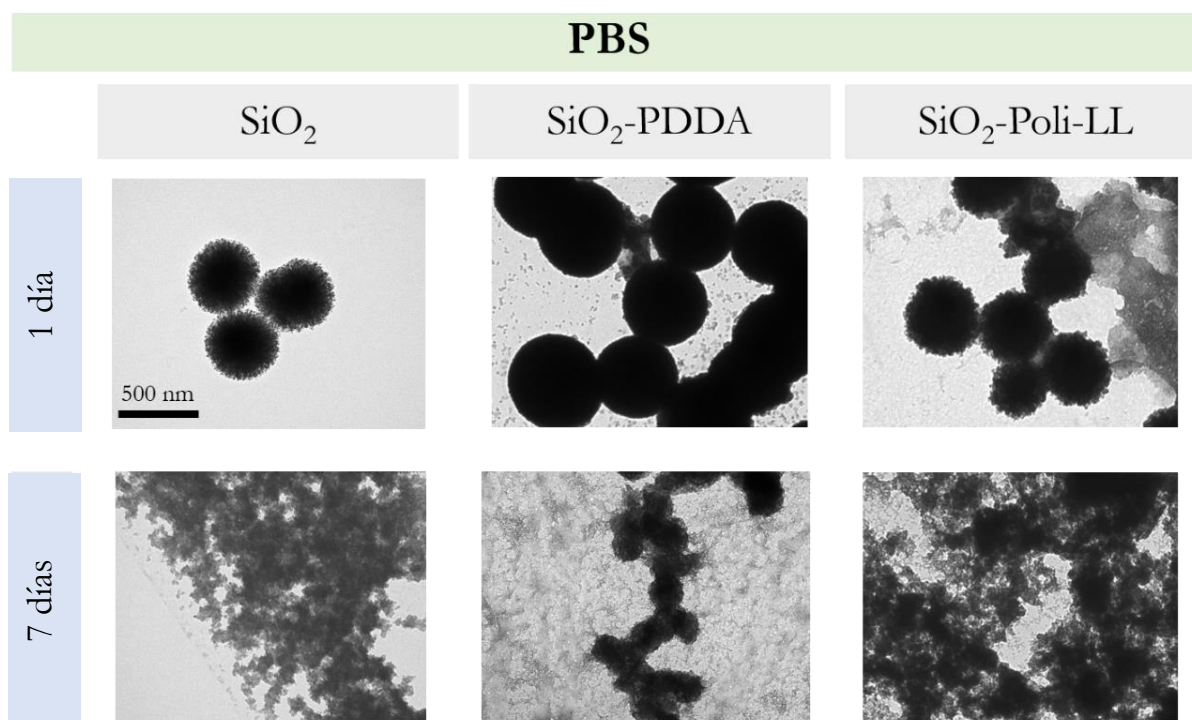
8.1. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA *IN VITRO*

La degradación de la sílice depende de diferentes parámetros como la forma de las partículas, la química de la superficie, la porosidad, la funcionalización de la superficie, la concentración, etc. (Finnie et al, 2009; Hao et al, 2012; Braun et al, 2016; Shi et al, 2017; Croissant et al, 2017), que pueden afectar a las interacciones entre las nanopartículas y los sistemas biológicos. Por eso, es muy importante controlar la superficie y el recubrimiento de éstas, ya que dependiendo de esto podremos aumentar o disminuir la velocidad de degradación del sistema y controlar la liberación de la terapia encapsulada. Dicha degradación ha sido estudiada en la literatura en diferentes medios como PBS, fluidos corporales sintéticos, fluidos pulmonares sintéticos y fluidos gástricos sintéticos, observándose la mayor degradación en el medio pulmonar, seguido del medio corporal en el que el grado de degradación es similar al observado para PBS. En el fluido gástrico se observa la menor degradación (Vallet-Regí *et al*, 2018; Braun *et al*, 2016).

Como se describe en la sección metodológica de esta tesis, en nuestro diseño, la unión de los nanotubos de carbono a las partículas de sílice se hace mediante a una interacción electrostática a través de polielectrolitos. Para analizar cómo el recubrimiento afecta a la velocidad de degradación de las partículas, estudiaremos la degradación *in vitro* de partículas con y sin recubrimiento de polielectrolitos (PDDA y Poli-L-L). Por un lado, recubriremos las partículas con PDDA, que es un polielectrolito con una tasa de degradación celular pequeña, y, por otro lado, utilizaremos la Poli-L-L, que es un polímero natural sensible a la degradación enzimática intracelular, por lo que se puede afirmar que es biodegradable y biocompatible (Hartono *et al*, 2012). En el estudio incubamos 175 µg/mL de las partículas de 1 a 7 días en los medios indicados en condiciones parecidas a las fisiológicas (37 ° C en rotación). La evaluación del proceso de degradación se determinó mediante observación de las partículas al microscopio electrónico, determinándose la media del diámetro de las partículas tras el proceso (**figura 57**).

Este estudio reveló un patente proceso de degradación en las partículas de sílice mesoporosa tras 7 días de incubación en las condiciones descritas. La desaparición de los perfiles de las

partículas sugirió una degradación superficial visible en PBS observándose una destrucción total a partir de los 7 días sin ningún recubrimiento o con el recubrimiento de Poli-L-Lisina.



	SiO ₂ 7 días	SiO ₂ -PoliLL 7 días	SiO ₂ -PDDA 7 días	SiO ₂ SiO ₂ -PoliLL	SiO ₂ SiO ₂ -PDDA	SiO ₂ -PoliLL SiO ₂ -PDDA
Valor <i>t</i>	92.9	88.01	50.42	3.08	5.99	14.15
Grados de libertad	247	190	199	289	194	311
Significancia	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

Figura 57. (Arriba) Imágenes de microscopía electrónica donde se puede observar la diferencia de tamaño de las partículas al ser incubadas durante 1 o 7 días en PBS. (Abajo) se encuentra un diagrama de barras representando el diámetro de las partículas y la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la

La cuantificación de los diámetros viendo una clara disminución de tamaño cuando los tres tipos de partículas se incuban durante 1 semana en PBS. Sin embargo, cuando incubamos las partículas en medio lisosomal sintético no se observa disminución alguna (**figura 58**). Esto es

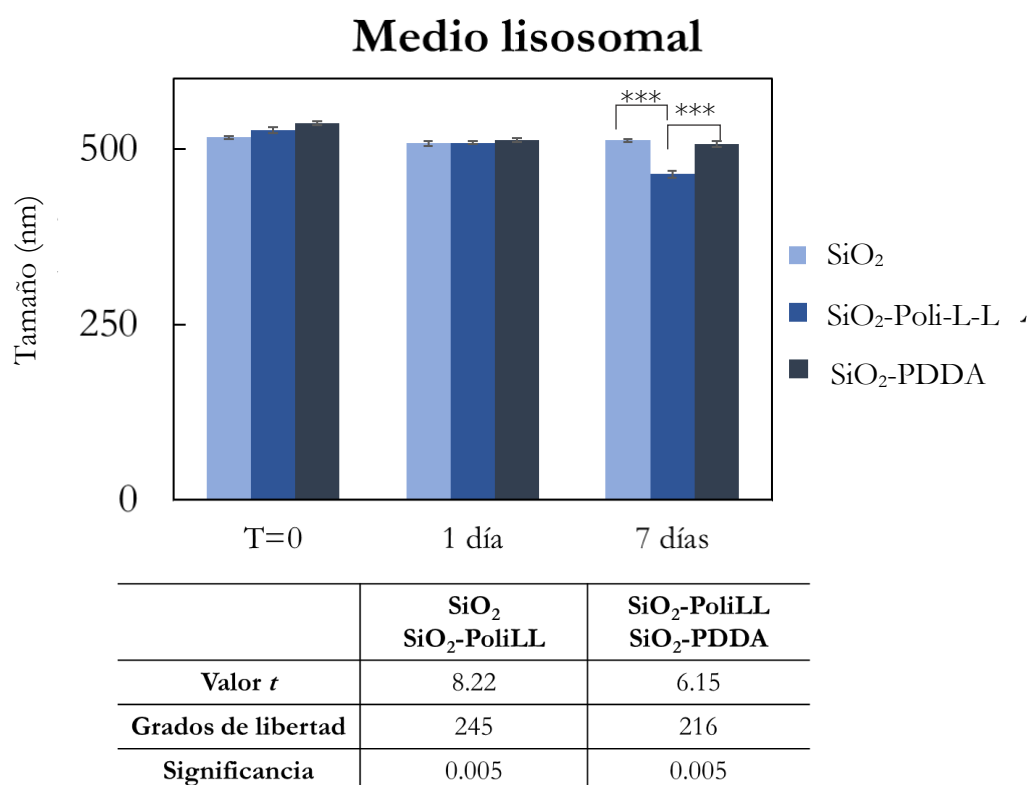
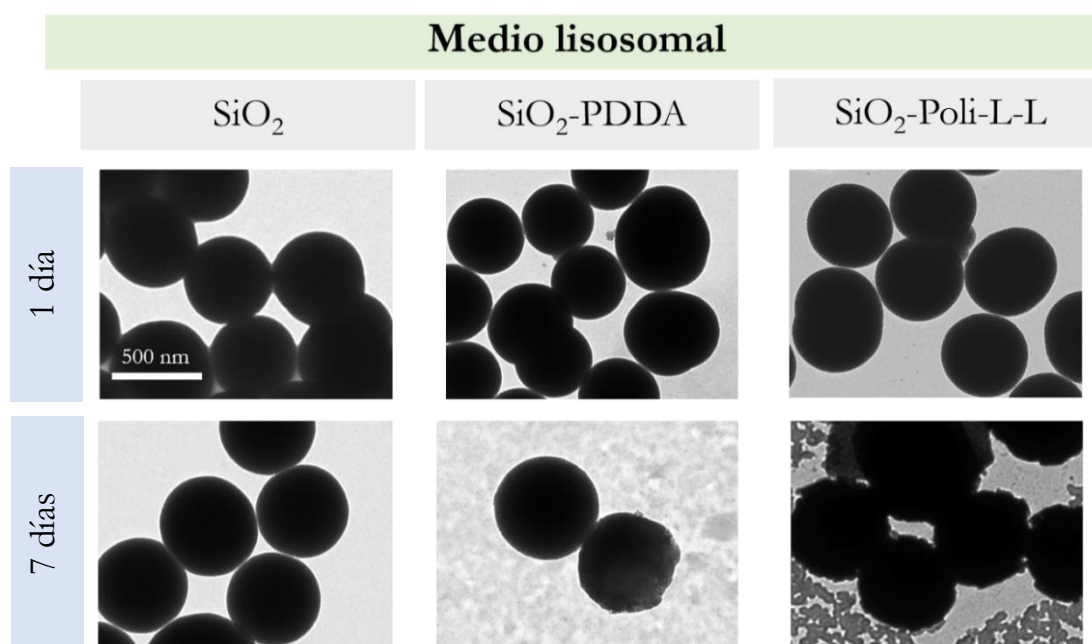


Figura 58. (Arriba) Imágenes de microscopía electrónica donde se puede observar el tamaño de las partículas al ser incubadas durante 1 o 7 días en medio lisosomal. (Abajo) se encuentra un diagrama de barras representando el diámetro de dichas partículas, y la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

debido a que la solubilidad de la sílice es dependiente del pH, siendo la más alta en condiciones de pH alcalinas (Choi & Kim, 2019).

Estos estudios demuestran cómo, en condiciones *in vitro* simulando las fisiológicas, es posible afirmar que las partículas de sílice mesoporosa son biodegradables, al menos a subunidades pequeñas que podrían ser eliminadas por las células o el organismo de forma más fácil. Esta degradación es, además, esta degradación es dependiente del medio en el que se encuentran siendo más posible que la degradación ocurre a nivel citoplasmático o extracelular que a nivel lisosomal.

8.2. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA *IN VIVO*

La degradación intracelular de las nanopartículas de sílice aparece menos descrita en la literatura. Quignard y colaboradores obtuvieron una primera visión de la vía de disolución intracelular de las nanopartículas de sílice amorfa mediante una combinación de imágenes de TEM y microscopía de fluorescencia. Así, demostraron que las nanopartículas de sílice cargadas positivamente son absorbidas como agregados por fibroblastos dérmicos humanos, disolviéndose intracelularmente en una semana y liberándose partículas de menor tamaño (Quignard *et al*, 2012). Esta disminución del tamaño de partícula se atribuyó a la erosión de la superficie como resultado del equilibrio de disolución de la sílice. Desde entonces, se han observado diferentes evidencias de la capacidad de la sílice para disolverse intracelularmente como en los estudios liderados por Zhai (Zhai *et al*, 2012), Chen (Chen *et al*, 2015a), Tiita (Tiitta *et al*, 2013) y Kempen (Kempen *et al*, 2015), entre otros. Por ello, se estudió la degradación intracelular de nuestro sistema mediante imágenes de microscopía electrónica, microscopía confocal y ICP-OES. En estudios anteriores observamos la degradación de nanotubos de carbono en macrófagos, debido a que pueden degradar todo tipo de biomoléculas capturadas por las rutas de entrada endocíticas o fagocíticas, gracias a sus lisosomas, que tienen un pH ácido de 4.5 y una gran variedad de enzimas (ácido hidrolasa y peroxidasa).

8.2.1. DEGRADACIÓN EN MACRÓFAGOS

El primer tipo celular que utilizamos para estudiar la degradación de la sílice fueron macrófagos de ratón de la línea J774. Se administraron 15 µg/mL de partículas sin polielectrolito y con PDDA y Poli-L-L a esta línea celular por su gran capacidad degradativa de todo tipo de materiales. Como se observa en la **figura 59**, las partículas incubadas durante una semana en los macrófagos presentaban daños en la superficie, observándose zonas de la partícula más claras

que otras. Para cuantificar dicha degradación, medimos la cantidad de Si en el medio mediante la técnica de ICP-OES. Como se muestra en la **figura 60** la concentración de silicio iba aumentando conforme aumenta el tiempo de exposición de dichas partículas en los macrófagos, lo que nos sugiere que las partículas de sílice mesoporosa con y sin polielectrolitos se degradaban. Además, se observa un aumento en la degradación de las partículas recubiertas con Poli-L-L, por lo que el recubrimiento de éstas podría ser un factor clave para poder controlar la degradación y liberación de las mismas.

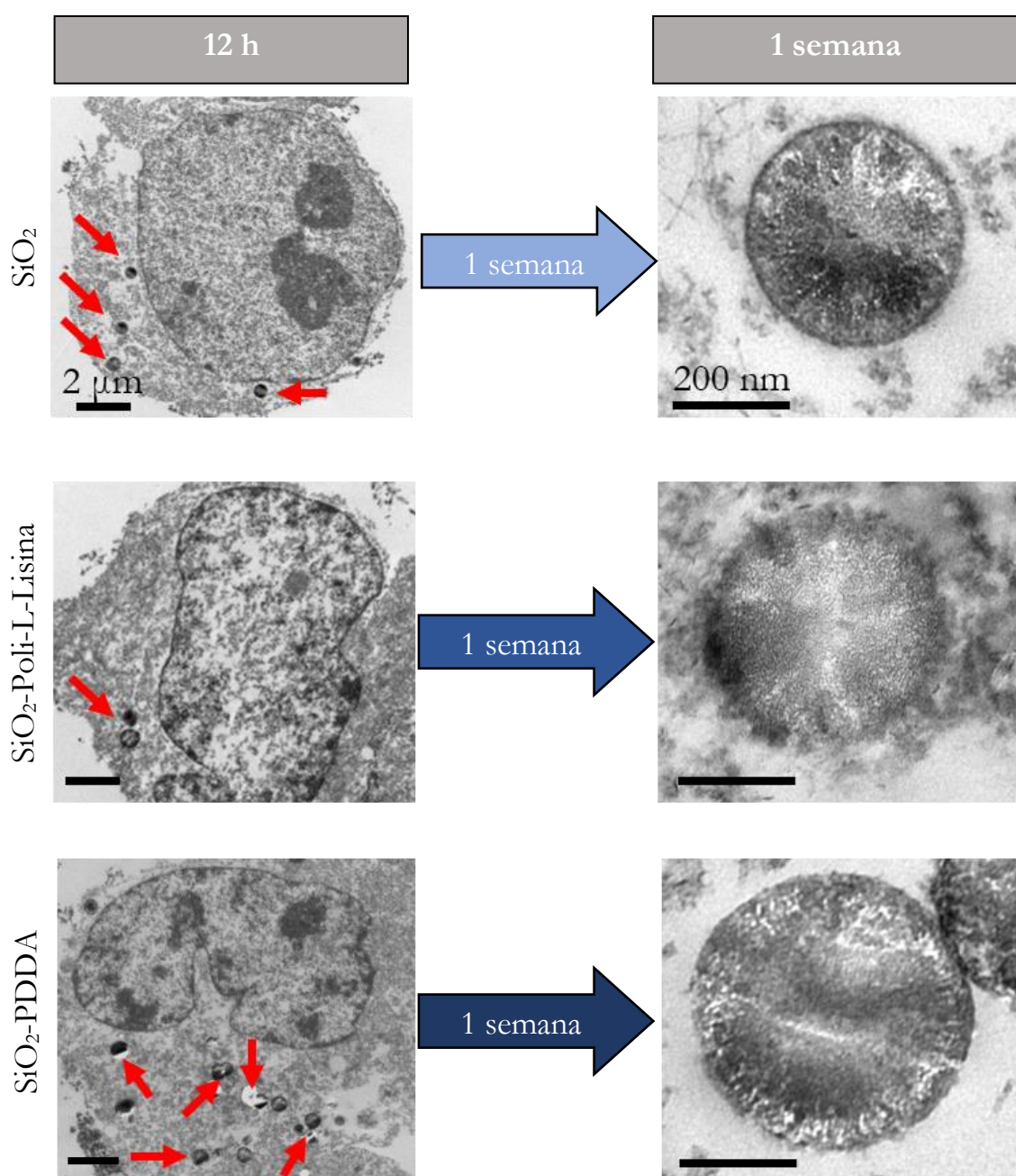


Figura 59. Imágenes de microscopía electrónica donde se observan macrófagos de ratón con partículas SiO₂, SiO₂-Poli-L-L y SiO₂-PDDA tras 12 h y 7 días de exposición. Las flechas rojas indican el lugar de las partículas en las células tras 12 h.

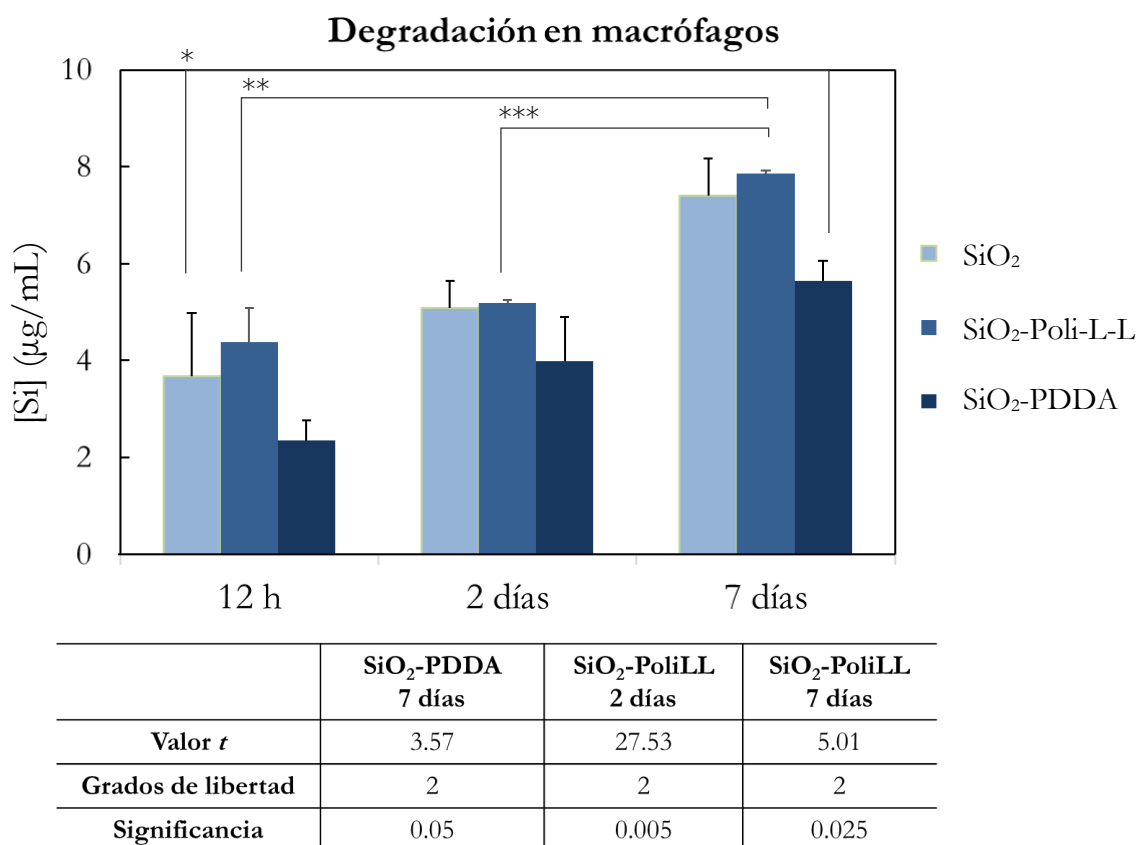


Figura 60. (Arriba) Diagrama de barras representando la concentración de Si en el medio extracelular tras 12 h, 2 y 7 días tras la administración de 15 µg/mL de partículas y (abajo) la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

8.2.2. DEGRADACIÓN EN CÉLULAS HeLa

A continuación, una de las posibilidades que se nos planteó era si las nanopartículas se degradaban extracelularmente tras ser exocitadas. Para comprobar si la degradación de la sílice ocurría mayoritariamente en el interior celular, recubrimos las nanopartículas con nanotubos de carbono y estudiamos su degradación. De este modo, tal y como hemos demostrado en los estudios previos, aseguramos que las partículas penetrarán en el citosol y no escaparán al compartimento extracelular. Este estudio se realizó en células HeLa. Como este modelo celular no dispone de un mecanismo degradativo tan importante como el de los macrófagos, nos pareció significativo estudiar la degradación en él, ya que dicho mecanismo degradativo podría ser similar al de otro tipo de células como las neuronas, donde podríamos utilizar este sistema de transporte para encapsular fármacos para el tratamiento de enfermedades como las neurodegenerativas.

La hipótesis que proponemos, resumida en la **figura 61**, muestra cómo las partículas SiO₂ mesoporosa con nanotubos de carbono, una vez dentro de las células escaparían de las

membranas de los endolisosomas al citoplasma, donde pensamos que comenzaría la degradación de todo el sistema.

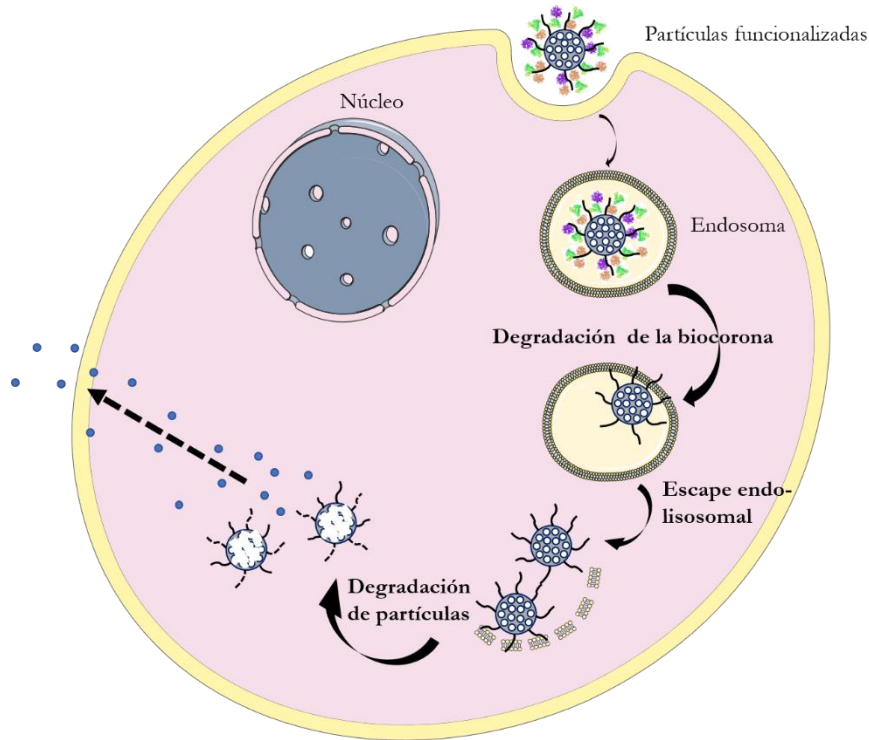


Figura 61. Hipótesis de degradación de las partículas de sílice con nanotubos de carbono que se plantea en células HeLa.

Este modelo se pudo corroborar mediante microscopía electrónica de transmisión. En la **figura 62** se observa cómo las partículas tras una semana de exposición, han perdido su estructura interior (flechas negras). Esta degradación de la sílice la cuantificamos mediante ICP-OES, recogiendo el medio extracelular de las células incubadas con partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ y midiendo la concentración de Si en el medio.

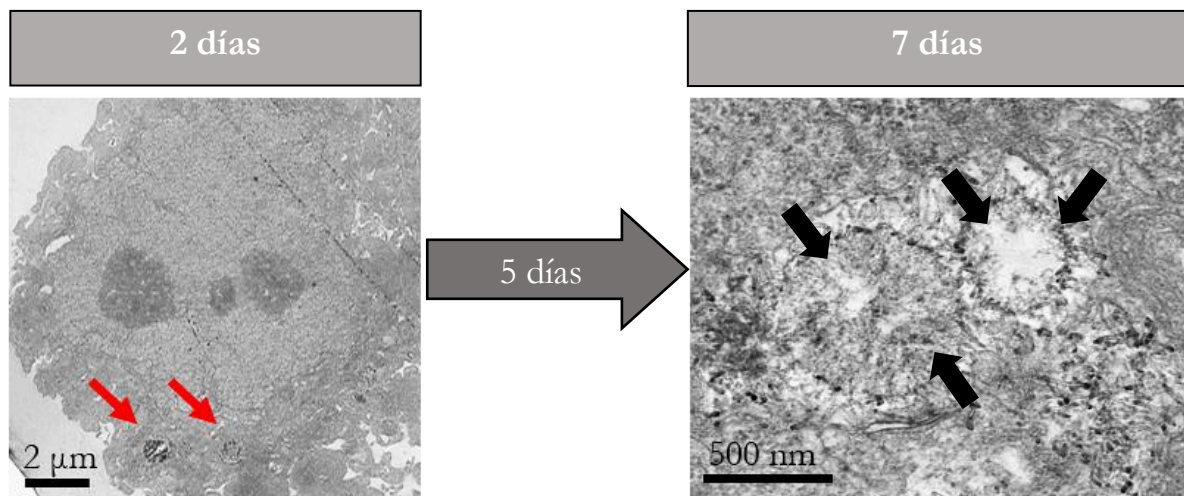


Figura 62. Imágenes de microscopía electrónica donde se observan células HeLa tras 2 días y 7 días de la administración de partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$.

Como se observa en la **figura 63** la cantidad de Si en el medio aumentaba con el tiempo de incubación, hecho que demuestra que las partículas también se degradan en el citoplasma de las células HeLa. Además, vemos un aumento de la concentración de sílice cuando se administran partículas con nanotubos de carbono por lo que podemos concluir que dicha degradación está ocurriendo en el citoplasma celular, lo que apoyaría los estudios *in vitro*.

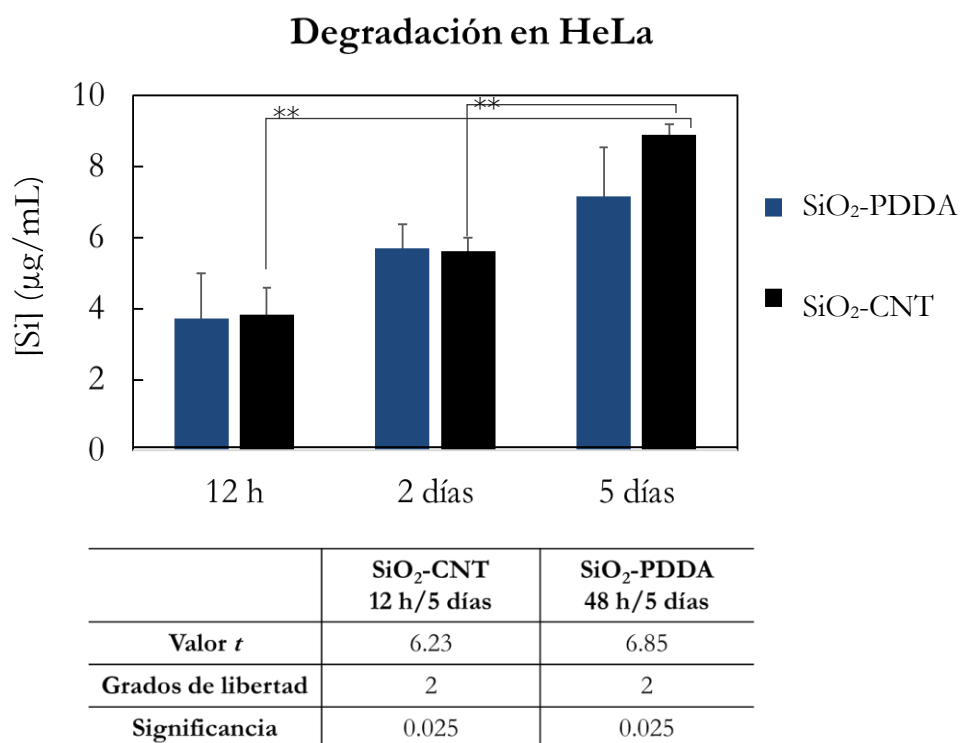


Figura 63. (Arriba) Diagrama de barras representando la cantidad de Si en el medio extracelular tras 12 h, 2 y 5 días después de la administración de 15 µg/mL de partículas y (abajo) la tabla que recoge el tratamiento estadístico de los datos, donde se muestra el valor de la *t* de student, los grados de libertad y la significancia.

La velocidad de degradación de las partículas de sílice mesoporosa se comparó a las de sílice amorfa mediante microscopía confocal (**figura 64**). Para poder trazar las partículas intracelularmente *in vivo*, se utilizaron partículas de sílice marcadas con un recubrimiento fluorescente rojo (rodamina) ligado a su superficie, y se comparó la degradación de partículas de sílice mesoporosa y amorfa. En la **figura 59** se observa cómo las partículas de sílice mesoporosa (derecha) van perdiendo fluorescencia después de 72 h de administración, pero no en las partículas de sílice amorfa lo que indica que la superficie de la sílice mesoporosa se degrada más rápidamente, liberándose el colorante.

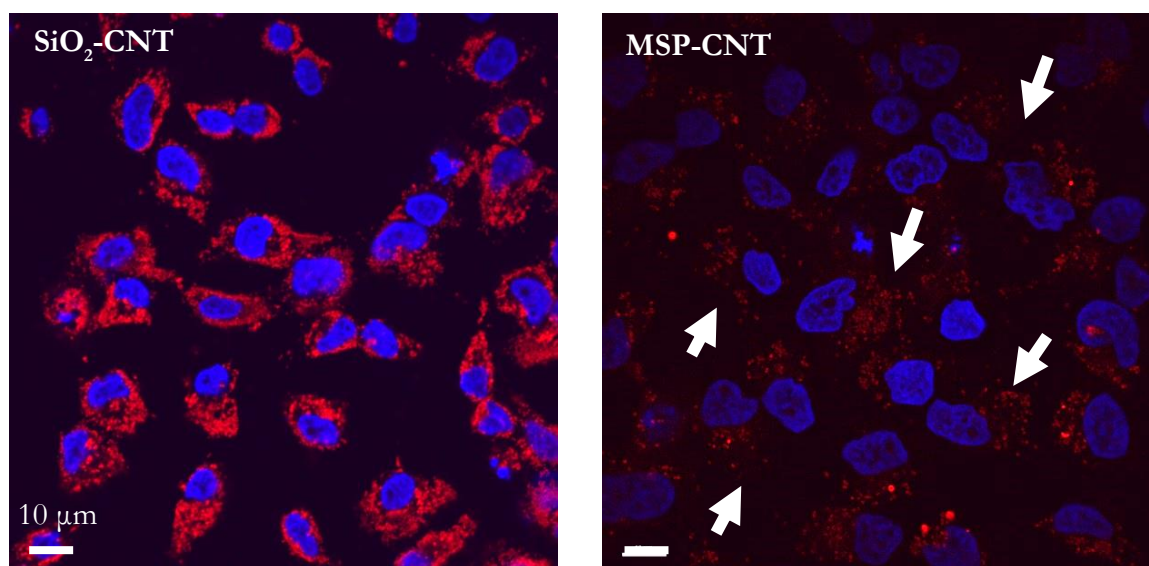


Figura 64. Imágenes de microscopía confocal donde se muestran partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ sólidas (izquierda) y partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT}$ de sílice mesoporosa (derecha). Las flechas blancas indican partículas que están siendo degradadas.

8.2.2.1. Degradación de partículas $\text{SiO}_2\text{-CNT-PED}$ mesoporosa

Como se estudió en el capítulo anterior, según el modelo que hemos propuesto en la **figura 55**, cuando los nanotubos de carbono se unen a las partículas mediante un polielectrolito degradable, estos se liberan al citoplasma, mientras que las partículas de sílice sin recubrimiento parecen sufrir ciclos de exocitosis-endocitosis, donde en cada ciclo la superficie de la sílice se va modificando (González-Lavado *et al*, 2018). La **figura 65** confirma nuestra hipótesis donde se ven las partículas de sílice mesoporosa en el exterior celular degradadas.

9. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE UN COLORANTE COMO PRUEBA DE CONCEPTO

Como se ha estudiado a lo largo de este trabajo, la degradación y el destino de las partículas depende en gran parte del recubrimiento que tengan. Así, mediante estos estudios hemos podido ver que con un recubrimiento de nanotubos de carbono oxidados podemos cambiar el destino intracelular de las partículas, haciendo que éstas escapen al citoplasma, y mejorando, por consiguiente, la degradación citoplasmática de las partículas. Por ello, se puede modificar el recubrimiento de las partículas dependiendo del fármaco que encapsulemos y dependiendo del tiempo de liberación que queramos obtener. Para ver si el recubrimiento influía en la velocidad

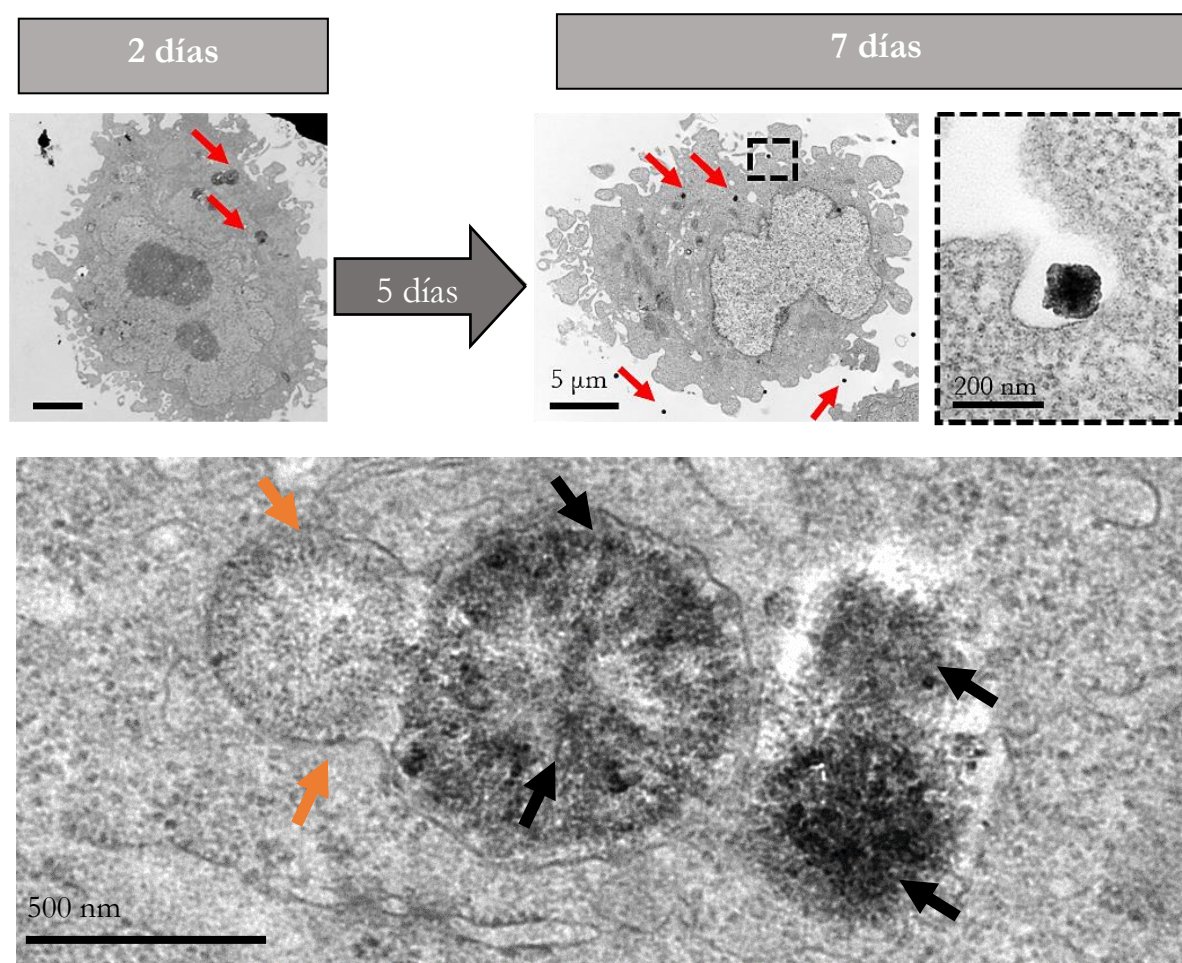


Figura 65. Imágenes de TEM de cortes ultrafinos de células HeLa con partículas de sílice mesoporosa y CNT unidos con un polielectrolito biodegradable a diferentes tiempos. Las flechas rojas señalan partículas exocitadas. Las flechas negras de la imagen de abajo señalan partículas degradadas y las naranjas la fusión de un lisosomal a una partícula.

de liberación de nuestro sistema estudiamos la liberación de un colorante de las partículas de sílice mesoporosa utilizando los polielectrolitos PDDA y Poli-L-L.

El colorante que se utilizó para estudiar si el recubrimiento influía en la liberación fue el naranja de acridina (AO). Este colorante emite en verde, no es tóxico para las células y además nos va a permitir ver la liberación en células posteriormente. Para poder estudiar el porcentaje de encapsulación del colorante, primero, se determina la curva de calibrado de la naranja de acridina, midiendo la emisión de disoluciones de concentración conocida en etanol (**figura 66**). Después, se realizarán medidas de la emisión del sobrenadante obtenido tras centrifugar la muestra una vez incubada con el colorante (**figura 67**).

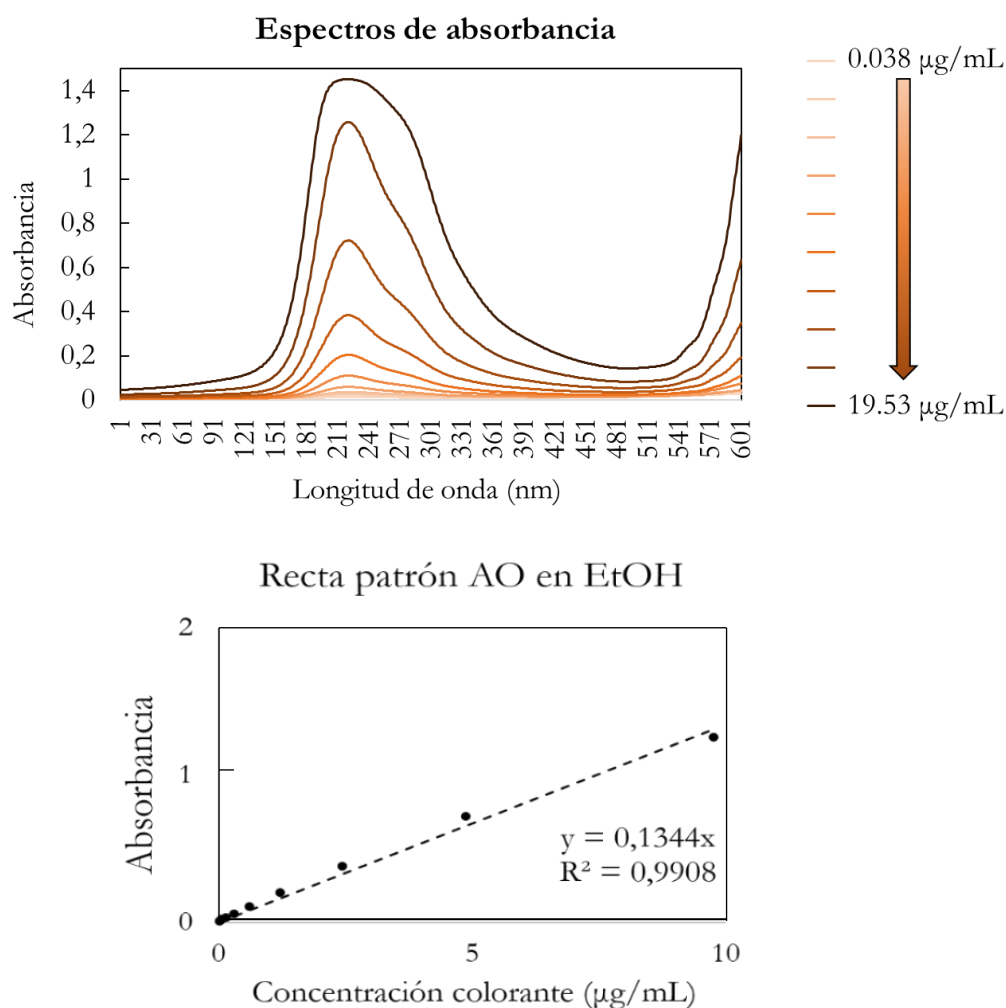


Figura 66. (Arriba), espectros de absorbancia de la AO a diferentes concentraciones en etanol y (abajo) recta patrón a 490 nm de la naranja de acridina en etanol.

Una vez obtuvimos la recta patrón, cuantificamos la encapsulación de 0.25 mg/mL de colorante en 47 mg partículas (en un volumen de 8 mL) durante 3 h en agitación y oscuridad. Tras la incubación se recogieron los sobrenadantes de todos los lavados y se midieron los espectros de absorbancia (**figura 67**). El primer sobrenadante, estaba muy concentrado, por lo que tuvimos que diluir la muestra (1:8). A continuación se calculó mediante la recta patrón $y = 0.1344x$, la cantidad de colorante presente en los diferentes lavados (**tabla 6**). De esta manera, y sabiendo que la cantidad de AO de partida era de 2 mg, se pudo estimar indirectamente que un 47 % de AO inicial había sido encapsulada (**figura 67, abajo**).

Tabla 6. Resumen de los valores de absorbancia a 490 nm del AO en los diferentes lavados, la concentración de AO de los diferentes lavados y la cantidad de AO total en μg en los lavados de la encapsulación.

	Absorbancia (490 λ)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	μg totales
Sobrenadante	1.4	10.5	881
1^{er} Lavado	1.5	11.3	113.4
2^{do} Lavado	0.6	4.2	41.6
3^{er} Lavado	0.2	1.3	12.9
4^o Lavado	0.10	0.8	7.9
5^o Lavado	0.05	0.4	1.8
6^o Lavado	0.03	0.3	1.3
7^o Lavado	0.05	0.4	1.9
TOTAL			1061.8

A continuación recubrimos las partículas con los polielectrolitos PDDA y Poli-L-L para estudiar la liberación de los colorantes *in vitro* en diferentes medios. Ambos tipos de partículas se incubaron en PBS a pH 7.4 y medio lisosomal sintético con un pH 4.5 y 37 ° C durante diferentes tiempos (24 h, 72 h, 1 semana y 2 semanas). Tras la incubación, las partículas se centrifugaron y se analizaron los sobrenadantes por espectroscopía de fluorescencia. Este experimento reveló que el recubrimiento de las partículas influía en la liberación del colorante encapsulado (**figura 68**). Las partículas recubiertas con el polielectrolito PDDA liberaban el colorante tanto en PBS como en medio lisosomal. Sin embargo, las partículas recubiertas con Poli-L-L no liberaban el colorante cuando se incubaban en PBS a pH 7.4. Para poder entender si esta liberación se debía al pH ácido, estudiamos la liberación del colorante en agua a diferentes pHs como 4.5, 6.5 y 8.5. Como se observa en la **figura 69**, cuando las partículas se incuban en agua a diferentes pH, las partículas con PDDA liberan el colorante a los tres pH, sin embargo, las partículas con Poli-L-Lisina no son capaces de liberar el colorante en ambientes alcalinos (como el pH a 8.5). Como se ha descrito anteriormente, la velocidad de degradación de las partículas de sílice mesoporosa es mayor en condiciones neutras o alcalinas (Choi & Kim, 2019), por lo que parece lógico pensar que la liberación debería ser mejor en dichas condiciones. Este hecho podría ser explicable si el recubrimiento de la Poli-L-Lisina fuera el encargado sellar la liberación. Para investigar si la liberación del colorante se retrasa debido a la falta de degradación del polielectrolito, incubamos los dos tipos de partículas con tripsina, una proteasa capaz de

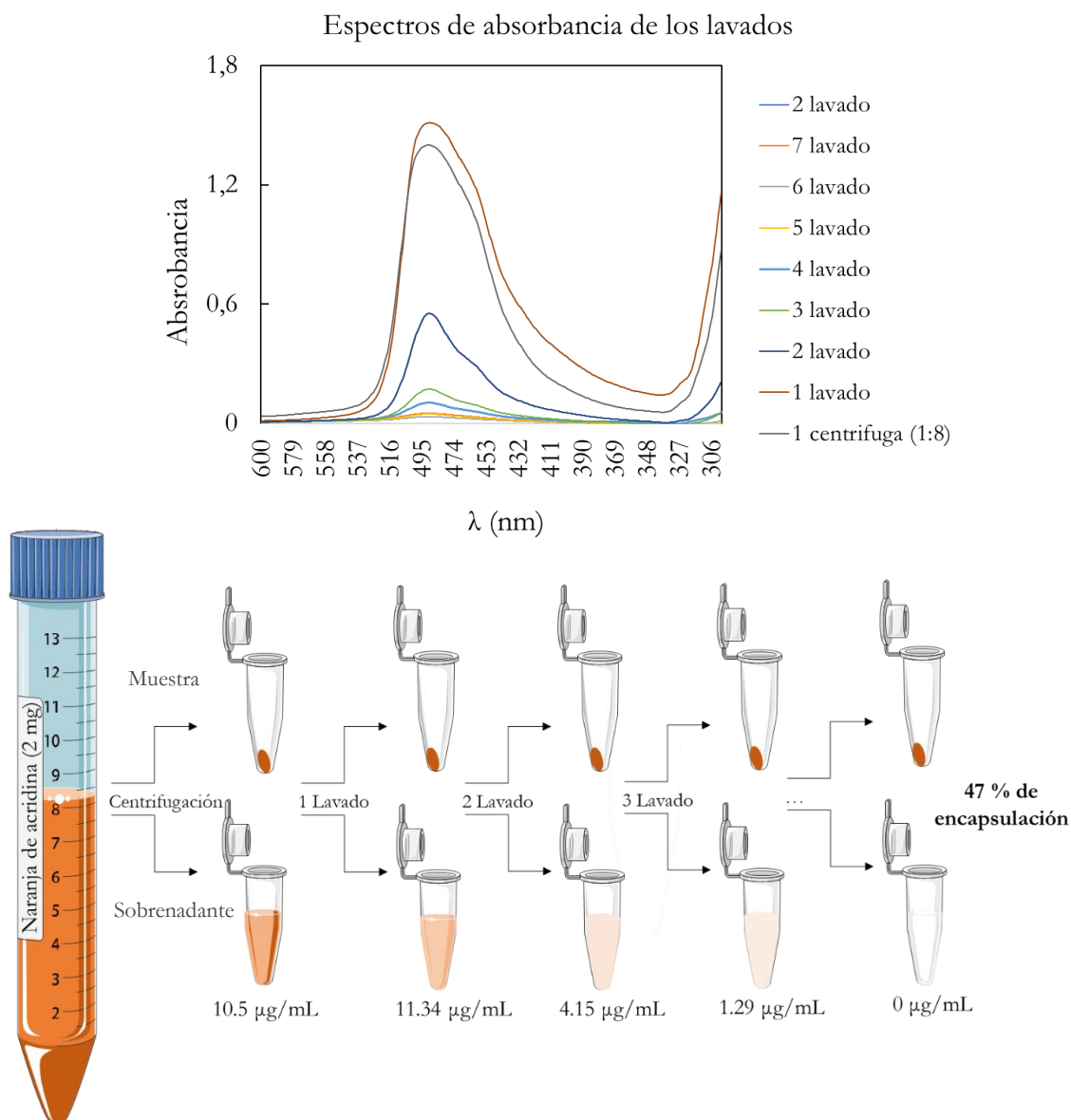


Figura 67. (Arriba) espectros de absorción de los diferentes lavados tras la encapsulación, (Abajo) Esquema representativo del proceso seguido para la determinación de la cantidad de naranja de acridina encapsulada

degradar la Poli-L-Lisina (Waley & Watson, 1953; Liu *et al*, 2001; Tolle *et al*, 2018). Una vez expuestas, las partículas de SiO₂-PDDA y SiO₂-Poli-L-L a la acción de la tripsina durante 4 h, se recogió el sobrenadante, se expusieron a PBS y a medio lisosomal sintético y tal y como se muestra en la **figura 70**, la degradación del polielectrolito mediante la tripsina favorece la liberación, por lo que se puede concluir el polielectrolito no estaba degradado, y que dicha degradación favorece la salida del colorante de la partícula. Además, se ha corroborado la degradación de las partículas con naranja de acridina en PBS (**figura 71**) tras una semana.

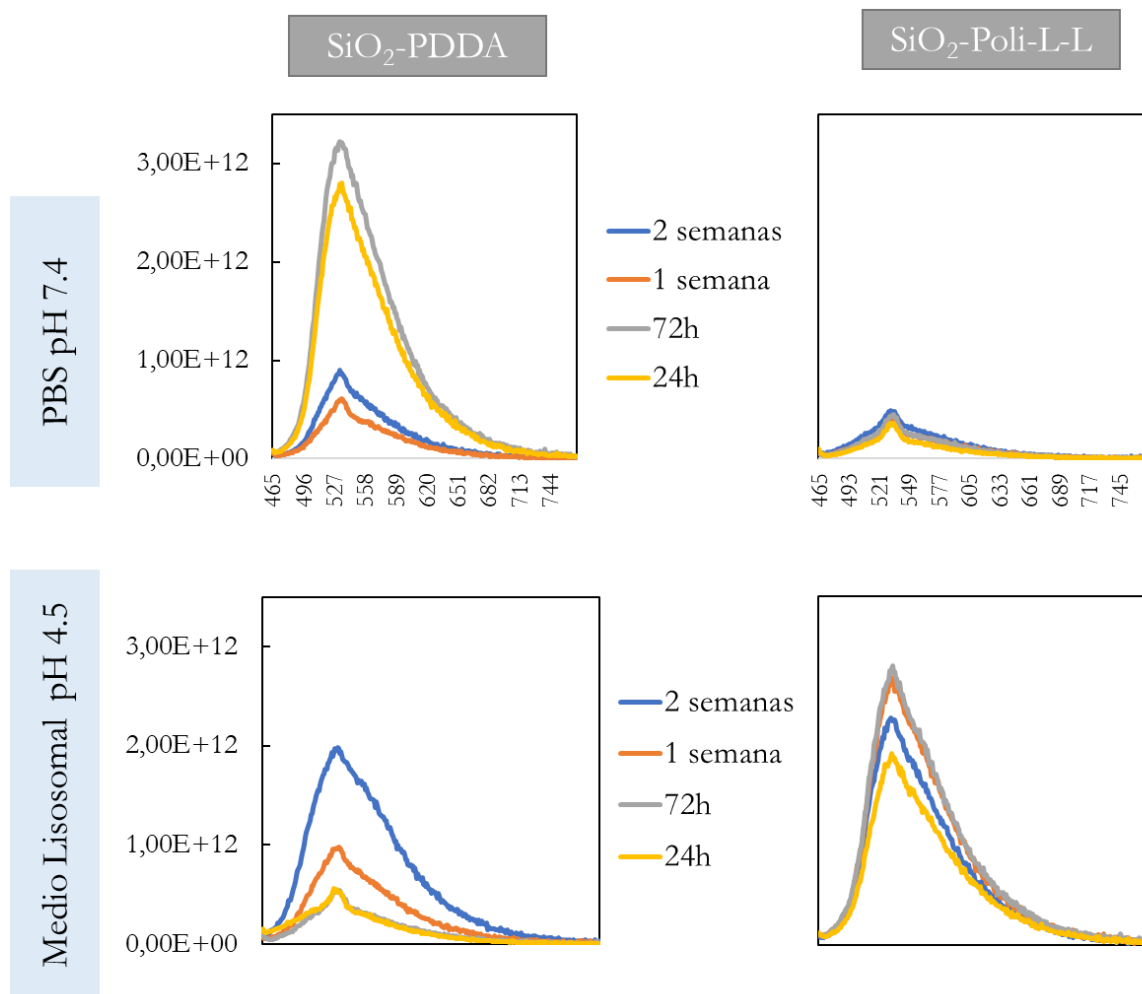


Figura 68. Espectros de fluorescencia de sobrenadantes a diferentes tiempos de partículas SiO₂-AO con PDDA o Poli-L-Lisina en PBS a pH 7.4 y medio lisosomal con un pH de 4.5.

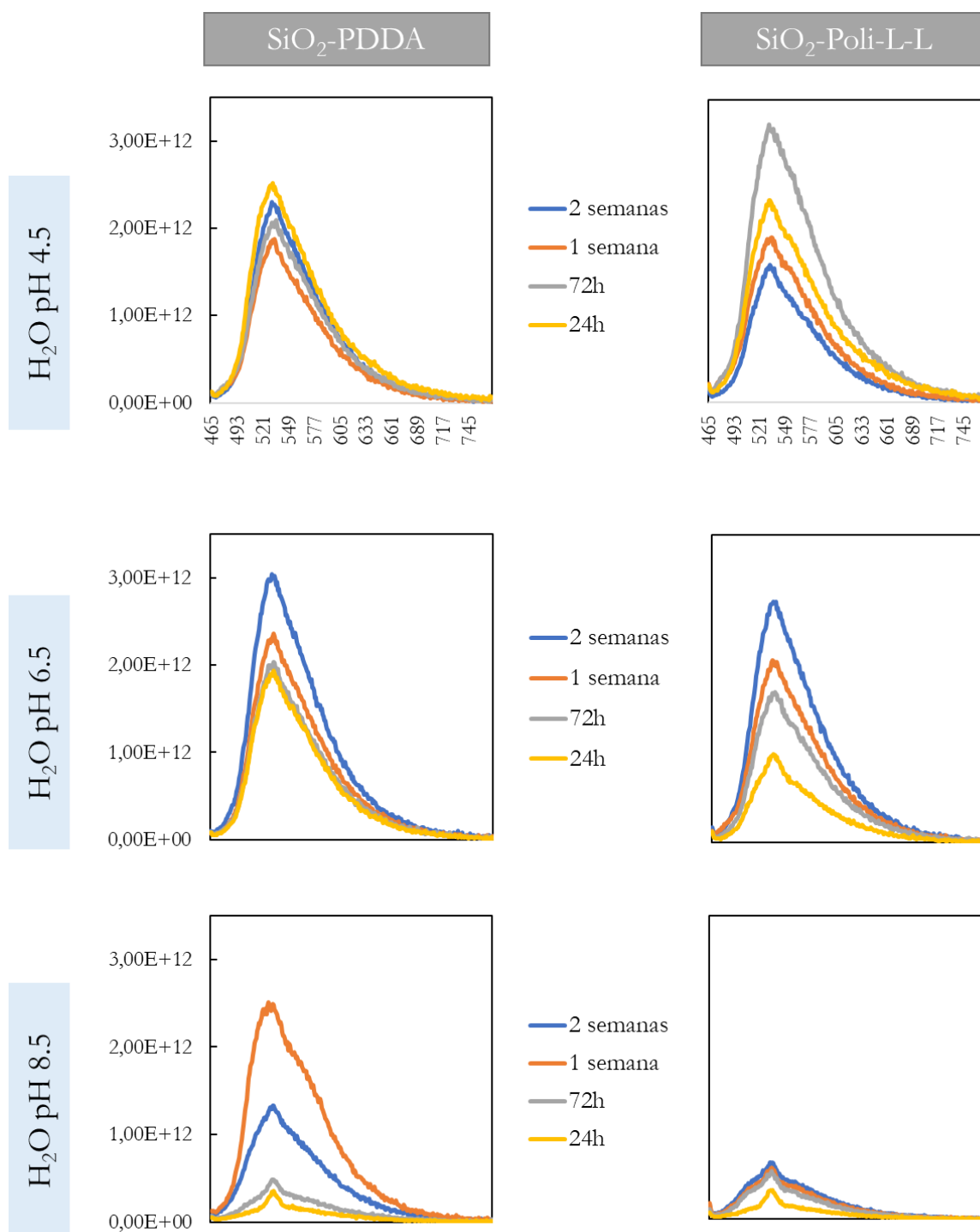


Figura 69. Espectros de fluorescencia del sobrenadante a diferentes tiempos de partículas $\text{SiO}_2\text{-AO}$ con PDDA o Poli-L-Lisina en agua a diferentes pH 4.5, 6.5 y 8.5.

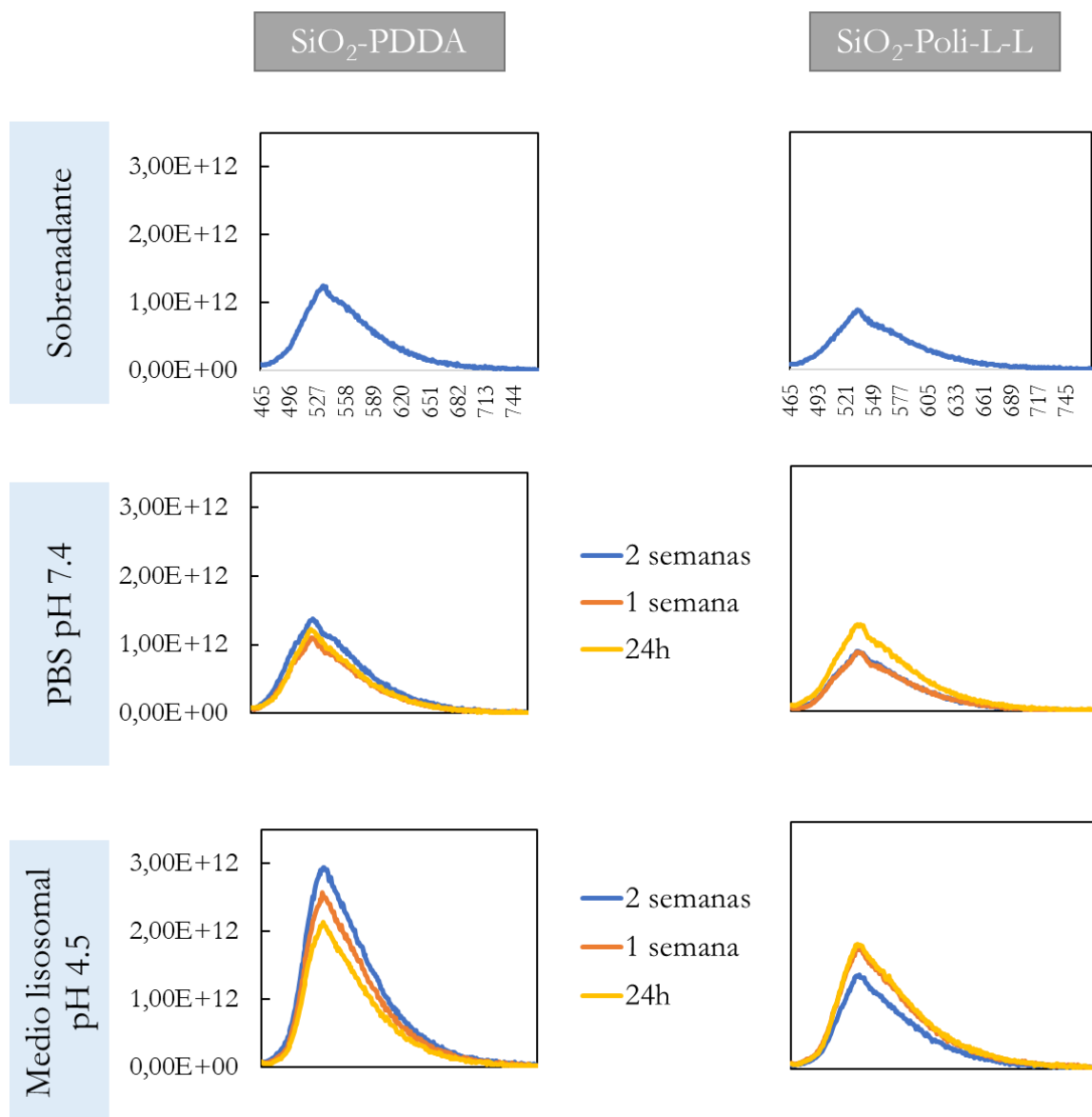


Figura 70. Espectros de fluorescencia de los sobrenadantes de diferentes tiempos de partículas $\text{SiO}_2\text{-AO}$ con PDDA o Poli-L-Lisina en PBS a pH 7.4 y medio lisosomal con un pH de 4.5, tras haber sido incubados con tripsina durante 4 h a 37 °C.

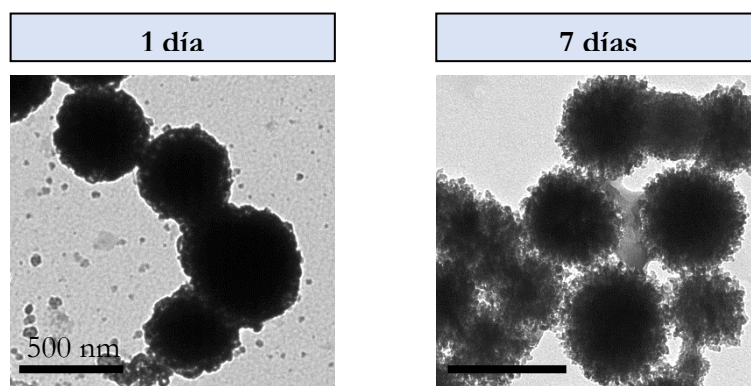


Figura 71. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de partículas SiO_2 -Poli-L-L con naranja de acridina encapsulado. Las partículas, tras 7 días de incubación en PBS están siendo degradadas como se observa en la imagen de la derecha.

Los resultados obtenidos hasta ahora mediante el estudio de este sistema de liberación de fármacos basado en nanotecnología nos ayudan a comprender la importancia del recubrimiento de las nanoestructuras para poder controlar la liberación de fármacos y la degradación posterior del sistema. Hemos visto cómo el recubrimiento de nanotubos de carbono mediante polielectrolitos permite que la entrada de las partículas a las células sea más rápida, así como un escape al citoplasma, pudiendo proteger, por ejemplo, terapias sensibles a pH. Además dicha salida citoplasmática aumenta la degradación de la cápsula con el consiguiente aumento de la liberación del fármaco encapsulado.

10. ESTUDIOS FUTUROS

El objetivo a largo plazo de este proyecto sería el desarrollo de un sistema de transporte y liberación controlada de fármacos inteligente, direccionable y biocompatible. Con este estudio hemos contribuido al diseño de un sistema de administración de fármacos versátil y aplicable a diferentes enfermedades. Este diseño dará la posibilidad en un futuro, de encapsular altas dosis de diferentes terapias y liberarlas exclusivamente en las células dianas, disminuyendo los efectos secundarios y maximizando la eficacia del tratamiento, además de, ofrecer la posibilidad de entregar varias terapias simultáneamente en el citosol de las células diana.

Para poder llevar a cabo este objetivo tan complejo, primero deberíamos estudiar la encapsulación de fármacos u otras terapias en nuestro sistema. Por un lado, se podrían encapsular fármacos, proteínas o material genético dentro de las partículas de sílice mesoporosa. Por otro lado, el recubrimiento de nanotubos de carbono también permite la unión de fármacos (tanto de manera covalente como con uniones más débiles) en su superficie. La posibilidad de

liberar una terapia combinada podría ser útil en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, para disminuir la probabilidad de generar resistencias.

Tras conocer el potencial de encapsulación de este sistema, se debería estudiar la liberación controlada de la terapia. Para ello, habría que investigar la degradación de los recubrimientos y la influencia de estos en la liberación a nivel celular. De esta manera se podría controlar el tiempo de liberación exacto de la terapia. Además, se podrían modificar los polielectrolitos, utilizando por ejemplo, polielectrolitos termosensibles que se degradarían con el aumento de la temperatura. Este calor, se podría conseguir con la unión de partículas magnéticas (hipertermia), de oro o con el propio recubrimiento de nanotubos de carbono (fototermia).

Una vez tengamos puesto a punto nuestro sistema a nivel celular, el siguiente paso sería el estudio del sistema *in vivo*. Para ello, podríamos estudiar diferentes variables como la degradación y biocompatibilidad del sistema, la liberación controlada y el direccionamiento. Para poder dirigir nuestro sistema podríamos unir proteínas de direccionamiento a la superficie de los nanotubos de carbono, generando así una cubierta al nanosistema que le confiera una identidad biológica.

V. Conclusiones

“Uno nunca ve lo que se ha hecho, sino que ve lo que queda por hacer”.

Marie Curie

1. Se ha sintetizado un nanosistema basado en partículas de sílice recubierta de nanotubos de carbono multipared biodegradables.
2. Esta cubierta de nanotubos de carbono favorece el contacto y captura por la ruta canónica de endocitosis mediada por receptores de las partículas en las células modelo.
3. Los nanotubos de carbono desencadenan el escape de las partículas de la ruta endolisosomal. Por el contrario, la ausencia de nanotubos resulta en la exocitosis y re-endocitosis de las partículas, modificándose su superficie con cada ciclo.
4. La administración de partículas con nanotubos de carbono no genera cambios significativos en las fases del ciclo celular ni aumenta el porcentaje de células apoptóticas ni necróticas en el periodo de observación. Estos estudios permiten concluir que los nanotubos de carbono agrupados en racimos no parecen ejercer un efecto citotóxico y refuerzan la hipótesis del efecto biomimético de éstos con los microtúbulos.
5. Los estudios de este trabajo demuestran que las partículas de sílice mesoporosa son más degradables en PBS a pH 7.4 *in vitro*, que en medio lisosomal sintético con un pH de 4.5. Las partículas con el recubrimiento de Poli-L-L se degradan antes que con el polielectrolito PDDA.
6. El aumento de Si en el medio extracelular de los macrófagos y células HeLa así como las imágenes de microscopía electrónica y confocal sugieren que las partículas de sílice se degradan intracelularmente.
7. La liberación del colorante depende de la degradación del recubrimiento de las partículas. Sólo cuando la Poli-L-L se degrada con tripsina se observa liberación del colorante de las partículas en PBS.

VI. Bibliografía

“La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben ser separadas”.

Rosalind Franklin

- Agostini A, Mondragón L, Bernardos A, Martínez-Mañez R, Marcos MD, Sancenón F, Soto J, Costero A, Manguan-García C, Perona R, Moreno-Torres M, Aparicio-Sanchis R & Murguía JR (2012) Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew. Int. Ed. Chemie* **51**: 1–6
- Akhmanova A & Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev.* **9**: 309–322
- Albulet D, Florea DA, Boarca B, Ditu LM, Chifiriuc MC, Grumezescu AM & Andronesu E (2017) Nanotechnology for personalized medicine: cancer research, diagnosis, and therapy. In *Nanostructures for Cancer Therapy*, Anton Ficaí & Grumezescu AM (eds) pp 1–21. Elsevier
- Al-Jamal KT, Nerl H, Müller KH, Ali-Boucetta H, Li S, Haynes PD, Jinschek JR, Prato M, Bianco A, Kostarelos K & Porter AE (2011) Cellular uptake mechanisms of functionalised multi-walled carbon nanotubes by 3D electron tomography imaging. *Nanoscale* **3**: 2627–2635
- Al-Rawi M, Diabaté S & Weiss C (2011) Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells. *Arch. Toxicol.* **85**: 813–826
- Amos LA & Baker TS (1979) The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* **279**: 607–612
- Arvizo R, Bhattacharya R & Mukherjee P (2010) Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opin Drug Deliv.* **7**: 753–763
- Asín L, Ibarra MR, Tres A & Goya GF (2012) Controlled cell death by magnetic hyperthermia: effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. *Pharm. Res.* **29**: 1319–1327
- Atala A, Lanza R, Thomson JA & Nerem R (2011) Principles of Regenerative Medicine. 2 Edition. Atala A Lanza R Mikos T & Nerem R (eds) London: Academic Press
- Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, Farzad SA, Peivandi MT, Ramezani M & Alibolandi M (2017) Synthesis of theranostic epithelial cell adhesion molecule targeted mesoporous silica nanoparticle with gold gatekeeper for hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine* **12**: 1261–1279
- 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
- Bastakoti BP & Liu Z (2017) Multifunctional polymeric micelles as therapeutic nanostructures: targeting, imaging, and triggered release. In *Nanostructures for Cancer Therapy*, Anton Ficaí & Grumezescu AM (eds) pp 261–283. Elsevier
- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM & Le L (2002) Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J. Anat.* **200**: 581–597
- Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ, Leonowicz ME, Kresg CT, Schmitt KD, Chu CT-W, Olson DH, Sheppard EW, McCullen SB, Higgins JB & Schlenkert JL (1992) New family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *J. Am. Soc.* **114**: 10834–10843
- Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-nami S, Mehrzadi S, Shakeri-zadeh A & Kamrava SK (2016) Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental

- principles to advanced applications. *J. Control. Release* **235**: 205–221
- Bellucci S, Dinicola S, Coluccia P, Bizzarri M, Catizone A, Micciulla F, Sacco I, Ricci G & Cucina A (2012) Multiwalled carbon nanotubes-induced cytotoxic effects on human breast adenocarcinoma cell line. *Int. Semicond. Conf.* **1**: 37–42
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N & Farokhzad OC (2014) Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**: 2–25
- Bhakta G, Mitra S & Maitra A (2005) DNA encapsulated magnesium and manganous phosphate nanoparticles: potential non-viral vectors for gene delivery. *Biomaterials* **26**: 2157–2163
- Bharti C, Nagaich U, Pal AK & Gulati N (2015) Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int. J. Pharm. Investig.* **5**: 124–133
- Bhatt A, Jain A, Gurnany E, Jain R, Modi A & Jain A (2016) Carbon nanotubes: a promising carrier for drug delivery and targeting. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, Holban A-M & Grumezescu AM (eds) pp 465–501. Elsevier
- Bhattacharya K, Mukherjee SP, Gallud A, Burkert SC, Bistarelli S, Bellucci S, Bottini M, Star A & Fadeel B (2016) Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**: 333–351
- Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodríguez-Serrano F, Perán M, Melguizo C & Aranega A (2011) Nanomedicine: Application areas and development prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 3303–3321
- Bozzuto G & Molinari A (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**: 975–999
- Bramhill J, Ross S & Ross G (2017) Bioactive nanocomposites for tissue repair and regeneration: A review. *Int J Env. Res Public Heal.* **14**: 1–21
- Brasnjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C & Martinez-Martinez P (2009) Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog. Neurobiol.* **87**: 212–251
- Braun K, Pochert A, Beck M & Fiedler R (2016) Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **79**: 319–327
- Bregoli L, Movia D, Gavigan-Imedio JD, Lysaght J, Reynolds J & Prina-Mello A (2016) Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**: 81–103
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A & Stark WJ (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 4374–4381
- Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ & Whyman R (1994) Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 801–802
- Burckhardt CJ & Greber UF (2009) Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *Plos Pathog.* **5**: e1000621
- Burns AA, Vider J, Ow H, Herz E, Penate-Medina O, Baumgart M, Larson SM, Wiesner U & Bradbury M (2009) Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion

- for nanomedicine. *Nano Lett.* **9**: 442–448
- Bystrzejewska-piotrowska G, Golimowski J & Urban PL (2009) Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag.* **29**: 2587–2595
- Cano AM, Maul JD, Saed M, Shah SA, Green MJ & Cañas-Carrell JE (2017) Bioaccumulation, stress, and swimming impairment in *Daphnia magna* exposed to multiwalled carbon nanotubes, graphene, and graphene oxide. *Environ. Toxicol. Chem.* **36**: 2199–2204
- Cao L, Wu X, Wang Q & Wang J (2018) Biocompatible nanocomposite of TiO₂ incorporated bi-polymer for articular cartilage tissue regeneration: A facile material. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **178**: 440–446
- Caoduro C, Hervouet E, Girard-Thernier C, Gharbi T, Boulahdour H, Delage-Mourroux R & Pudlo M (2017) Carbon nanotubes as gene carriers: focus on internalization pathways related to functionalization and properties. *Acta Biomater.* **49**: 36–44
- Carlier M-F & Pantaloni D (1981) Kinetic analysis of Guanosine 5'-Triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* **20**: 1918–1924
- Caruso G, Merlo L, Tot E, Pignataro C & Caffo M (2017) Nanotechnology and the new frontiers of drug delivery in cerebral gliomas. In *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems* pp 95–112. Elsevier Inc.
- Cauda V, Argyo C & Bein T (2010) Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **20**: 8693–8699
- Chang K, Baginski J, Hassan SF, Volin M, Shukla D & Tiwari V (2016) Filopodia and viruses: An analysis of membrane processes in entry mechanisms. *Front. Microbiol.* **7**: 1–13
- Chem JM, Cheng S, Liao W, Chen L & Lee C (2011) pH-controllable release using functionalized mesoporous silica nanoparticles as an oral drug delivery system. *J. Mater. Chem.* **21**: 7130–7137
- Chen F, Hong H, Shi S, Goel S, Valdovinos HF, Hernandez R, Theuer CP, Barnhart TE & Cai W (2014a) Engineering of hollow mesoporous silica nanoparticles for remarkably enhanced tumor active targeting. *Sci. Rep.* **4**: 5080
- Chen G, Teng Z, Su X, Liu Y & Lu G (2015a) Unique biological degradation behavior of stöber mesoporous silica nanoparticles from their interiors to their exteriors. *J. Biomed. Nanotechnol.* **11**: 722–729
- Chen T, Yu H, Yang N, Wang M, Dinga C & Jiajun F (2014b) Graphene quantum dot-capped mesoporous silica nanoparticles through an acid-cleavable acetal bond for intracellular drug delivery and imaging. *Mater. Chem. B* **2**: 4979–4982
- Chen X-X, Cheng B, Yang Y-X, Cao A, Liu J-H, Du L-J, Liu Y, Zhao Y & Wang H (2013) Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small* **9**: 1765–1774
- Chen Y, Ai K, Liu J, Sun G, Yin Q & Lu L (2015b) Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials* **60**: 111–120
- Cheng Y, Luo G, Zhu J, Xu X, Zeng X, Cheng D, Li Y, Wu Y, Zhang X, Zhuo R & He F

- (2015) Enzyme-induced and tumor-targeted drug delivery system based on multifunctional mesoporous silica nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**: 9078–9087
- Chithrani BD & Chan WCW (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **7**: 1542–1550
- Choi E & Kim S (2019) Surface pH buffering to promote degradation of mesoporous silica nanoparticles under a physiological condition. *J. Colloid Interface Sci.* **533**: 463–470
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, Bawendi MG & Frangioni J V (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1165–1170
- Chung JJ, Fujita Y, Li S, Stevens MM, Kasuga T, Georgiou TK & Jones JR (2017) Biodegradable inorganic-organic hybrids of methacrylate star polymers for bone regeneration. *Acta Biomater.* **54**: 411–418
- Chung T-H, Wu S-H, Yao M, Lu C-W, Lin Y-S, Hung Y, Mou C-Y, Chen Y-C & Huang D (2007) The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **28**: 2959–2966
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ & Wyatt MD (2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* **1**: 325–327
- Cossart P & Helenius A (2014) Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a016972
- Croissant JG, Fatieiev Y & Khashab NM (2017) Degradability and clearance of silicon, organosilica, silsesquioxane, silica mixed oxide, and mesoporous silica nanoparticles. *Adv. Mater.* **1604634**: 1–51
- Davis FF (2002) The origin of PEGnology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 457–458
- Desai A & Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83–117
- Dimov N, Kastner E, Hussain M, Perrie Y & Szita N (2017) Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Sci. Rep.* **7**: 1–13
- Dinicola S, Grazia Masiello M, Proietti S, Coluccia P, Fabrizi G, Palombo A, Micciulla F, Bistarelli S, Ricci G, Catizone A, De Toma G, Bizzarri M, Bellucci S & Cucina A (2015) Multiwalled carbon nanotube buckypaper induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia cell lines through modulation of AKT and MAPK signaling pathways. *Toxicol. Vitr.* **29**: 1298–1308
- Djuris AB, Leung YH, Ng AMC, Xu XY, Lee PKH, Degger N & Wu RSS (2014) Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*: 1–19
- Doktoringenieur G, Gutachter M, Prof T & Seidel-Morgenstern A (1956) Das komplexchemische verhalten der kieselsaure. *G Kolbe*
- Dong C, Eldawud R, Sargent LM, Kashon ML, Lowry D, Rojansakul Y & Dinu CZ (2015) Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung

- epithelial cells in a time-dependent manner. *J Mater Chem B Mater Biol Med* **3**: 3983–3992
- Dong X (2018) Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* **8**: 1481–1493
- Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K & Sadelain M (2018) Gene therapy comes of age. *Science*. **359**: 1–10
- Duncan R (2003) The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 347–360
- Duncan R & Izzo L (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 2215–2237
- Duncan R & Kopeček J (1984) Soluble synthetic polymers as potential drug carriers. *Polym. Med.* **57**: 51–101
- Ehlerding EB, Chen F & Cai W (2016) Biodegradable and renal clearable inorganic nanoparticles. *Adv. Sci.* **3**: 1500223
- Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernán Pérez De La Ossa D, Pita R, Vidal JM, Kohli A, Tothfalusi L, Sanh A, Tinton S, Robert JL, Silva Lima B & Amati MP (2013) Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine* **8**: 849–856
- Elbially N, Mahmoud M & Mohamed W (2015) Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.* **490**: 190–9
- Evans L, Mitchison T & Kirschner M (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**: 1185–1191
- Fan R, Wu Y, Li D, Yue M, Majumdar A & Yang P (2003) Fabrication of silica nanotube arrays from vertical silicon nanowire templates. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 5254–5255
- Fanarraga ML, Barroso RV & González AJG (2014) Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores.
- Fatieiev Y, Croissant JG, Julfakyan K, Deng L, Anjumb DH, Gurinovb A & Khashaba NM (2015) Enzymatically degradable hybrid organic–inorganic bridged silsesquioxane nanoparticles for in vitro imaging. *Nanoscale* **7**: 15046
- Feng W, Zhou X, He C, Qiu K, Nie W, Chen L, Wang H, Mo X & Zhanga Y (2013) Polyelectrolyte multilayer functionalized mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery: layer thickness-dependent release profiles and biocompatibility. *J. Mater. Chem. B* **1**: 5886–5898
- Ferreira P, Godinho M & Carvalho MD (2017) Nanoparticles for magnetic hyperthermia. In *Nanostructures for Cancer Therapy*, Ficaí A & Grumezescu A (eds) pp 485–511. Elsevier
- Ferris DP, Zhao Y, Khashab NM, Khatib HA, Stoddart JF & Zink JI (2009) Light-Operated Mechanized Nanoparticles. *JACS* **131**: 1686–1688
- Galligan JJ & Petersen DR (2012) The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics* **6**: 1–15
- Gao P, Zhang X, Wang H, Zhang Q, Li H, Li Y & Duan Y Biocompatible and colloiddally stabilized mPEG-PE/calcium phosphate hybrid nanoparticles loaded with siRNAs targeting tumors. *Oncotarget* **7**: 2855–2866
- Garay RP, El-Gewely R, Armstrong JK, Garratty G & Richette P (2012) Antibodies against

- polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**: 1319–1323
- 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. *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, Terán H, Fernández-Luna JL, Villegas JC & Fanarraga ML (2015b) Anti-cancer cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes. *Curr. Pharm. Des.* **21**: 1920–29
- García-Hevia L, Valiente R, Martín-Rodríguez R, Renero-Lecuna C, González J, Rodríguez-Fernández L, Aguado F, Villegas JC & Fanarraga ML (2016b) Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. *Nanoscale* **8**: 10963–10973
- García-Hevia L, Villegas JC, Fernández F, Casafont I, González J, Valiente R & Fanarraga ML (2016c) Multiwalled carbon nanotubes inhibit tumor progression in a mouse model. *Adv. Healthc. Mater.* **5**: 1080–1087
- Gauthier MA & Klok H-A (2010) Polymer-protein conjugates: An enzymatic activity perspective. *Polym. Chem.* **1**: 1352–1373
- Gisbert-Garzarán M, Manzano M & Vallet-Regí M (2017) pH-Responsive Mesoporous Silica and Carbon Nanoparticles for Drug Delivery. *Bioengineering* **4**: 1–27
- Gogoi M, Kumar N & Patra S (2016) Multifunctional magnetic liposomes for cancer imaging and therapeutic applications. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* pp 743–782. Elsevier Inc.
- González-Domínguez E, Iturrioz-Rodríguez N, Padín-González E, Villegas J, García-Hevia L, Pérez-Lorenzo M, Parak WJ, Correa-Duarte MA & Fanarraga ML (2017) Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible. *Int. J. Nanomedicine* **12**: 6317–6328
- González-Lavado E (2018) Nanodispensadores de fármacos antitumorales basados en nanotubos de carbono: diseño, evaluación y biocompatibilización.
- González-Lavado E, Iturrioz-Rodríguez N, Padín-González E, González J, García-Hevia L, Heuts J, Pesquera C, González F, Villegas JC, Valiente R & Fanarraga ML (2018) Biodegradable multi-walled carbon nanotubes trigger anti-tumoral effects. *Nanoscale* **10**: 11013–11020
- González-lavado E, Valdivia L, García-Castaño A, González F, Pesquera C, Valiente R & Fanarraga ML (2019) Multi-walled carbon nanotubes complement the anti-tumoral effect of 5-Fluorouracil. *Oncotarget* **10**: 2022–2029

- Goodman CM, Mccusker CD, Yilmaz T & Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* **15**: 897–900
- Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB & Natan MJ (1995) Preparation and characterization of Au colloids monolayers. *Anal. Chem.* **67**: 1217–1225
- Grenier P, Maíra De Oliveira Viana I, Martins Lima E & Bertrand N (2018) Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. *J. Control. Release* **287**: 121–131
- Guisasola E, Baeza A, Talelli M, Arcos D, Moros M, De La Fuente JM & Vallet-Regí M (2015) Magnetic-responsive Release Controlled by Hot Spot Effect. *Langmuir* **31**: 12777–12782
- Haley B & Frenkel E (2008) Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.* **26**: 57–64
- Hamada N, Sawada S & Oshiyama A (1992) New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Phys. Rev. Lett.* **68**: 1579–1581
- Han G, Martin CT & Rotello VM (2006a) Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des* **67**: 78–82
- Han G, You C, Kim B, Turingan RS, Forbes NS, Martin CT & Rotello VM (2006b) Light-Regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* **118**: 3237–3241
- Hao N, Li L & Tang F (2016) Roles of particle size, shape and surface chemistry of mesoporous silica nanomaterials on biological systems. *Int. Mater. Rev.*: 1–21
- Hao N, Liu H, Li L, Chen D, Li L & Tang F (2012) In vitro degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **12**: 6346–6354
- Hao Y, Zheng C, Wang L, Zhang J, Niu X, Song Q, Feng Q, Zhaoa H, Li L, Zhang H, Zhang Z & Zhang Y (2017) Tumor acidity-activatable manganese phosphate nanoplatform for amplification of photodynamic cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Acta Biomater.* **62**: 293–305
- Hartono SB, Gu W, Kleitz F, Liu J, He L, Middelberg AP, Yu C, Lu GQ (Max) & Qiao SZ (2012) Poly-L-lysine functionalized large pore cubic mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for gene delivery. *ACS Nano* **6**: 2104–2117
- Hasegawa U, Sawada S, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O & Akiyoshi K (2009) Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery. *J. Control. Release* **140**: 312–317
- He Q, Cui X, Cui F, Guo L & Shi J (2009) Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nano-spheres under a neutral condition. *Microporous Mesoporous Mater.* **117**: 609–616
- Helfand WH & Cowen DL (1983) Evolution of pharmaceutical oral dosage forms. *Pharm. Hist.* **25**: 3–18
- Hoffman AS, Zaffaroni A & Folkman AJ (2008) The origins and evolution of ‘controlled’ drug delivery systems. *J. Control. Release* **132**: 153–163
- Hu L, 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 I, Sun S, Cheng S, Lee C & Wu C (2011) Enhanced chemotherapy of cancer using pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles to antagonize P-Glycoprotein-Mediated drug resistance. *Ther. Discov.* **10**: 761–769
- Huang X, El-Sayed IH, Qian W & El-Sayed MA (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *JACS* **128**: 2115–2120
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH & El-Sayed MA (2007) Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* **2**: 681–693
- 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. *JACS* **129**: 6396–6397
- Iturrioz-Rodriguez N, González-Domínguez E, González-Lavado E, Marín-Caba L, Vaz B, Pérez-Lorenzo M, Correa-Duarte MA & Fanarraga ML (2017) A Biomimetic Escape Strategy for Cytoplasm Invasion by Synthetic Particles. *Angew. Int. Ed. Chemie* **56**: 13736–13740
- Iwai K, Maeda H & Konno T (1984) Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: enhanced therapeutic effect and X-Ray image. *Cancer Res.* **44**: 2115–2121
- Jackson TC, Patani BO & Israel MB (2017) Nanomaterials and cell interactions: A review. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **8**: 220–228
- Jain KK (2008) Drug delivery systems-an overview. In *Methods in Molecular Biology*, Jain KK (ed) pp 1196–1204. Humana Press
- Jain RK & Stylianopoulos T (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**: 653–664
- Janapareddi K, Jasti BR & Li X (2016) Evolution of controlled drug delivery systems. In *Drug delivery: principles and applications*, Wang B Hu L & Siahaan TJ (eds) pp 336–352. Wiley Online Library
- Jang JE, Cha SN, Choi YJ, Kang DJ, Butler TP, Hasko DG, Jung JE, Kim JM & Amaratunga GAJ (2007) Nanoscale memory cell based on a nanoelectromechanical switched capacitor. *Nat. Nanotechnol.* **3**: 26–30
- Jia BY, 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
- Jordan MA & Wilson L (1998) Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 123–130
- Kabanov A V. & Vinogradov S V. (2009) Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 5418–5429
- 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

- Karim R, Palazzo C, Evrard B & Piel G (2016) Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *J. Control. Release* **227**: 23–37
- Ke H, Wang J, Dai Z, Jin Y, Qu E, Xing Z, Guo C, Yue W & Liu J (2011) Gold-nanoshelled microcapsules: A theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy. *Angew. Int. Ed. Chemie* **50**: 3017–3021
- Kempen PJ, Greasley S, Parker KA, Campbell JL, Chang H, Jones JR, Sinclair R, Gambhir SS & Jokerst J V (2015) Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/magnetic resonance imaging of stem cells. *Theranostics* **5**: 631–642
- Kesharwani P, Xie L, Mao G, Padhye S & Iyer AK (2015) Hyaluronic acid-conjugated polyamidoamine dendrimers for targeted delivery of 3,4-difluorobenzylidene curcumin to CD44 overexpressing pancreatic cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **36**: 413–23
- Kesrevani RK & Sharma AK (2016) Nanoarchitected biomaterials: Present status and future prospects in drug delivery. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, Fikai A & Grumezescu AM (eds) pp 3–31. Elsevier
- Khosravian P, Ardestani MS, Khoobi M, Ostad SN, Dorkoosh FA, Javar HA & Amanlou M (2016) Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Onco. Targets. Ther.* **9**: 7315–7330
- Kohno S, Tomono K & Maesaki S (1998) Drug delivery systems for infection: Liposome-incorporating antimicrobial drugs. *J Insect Chemother* **4**: 159–173
- Kostarelos K (2008) The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat. Biotechnol.* **26**: 774–776
- Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J, Godefroy S, Pantorotto D, Briand J-P, Muller S, Patro M & Bianco A (2007) Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat. Nanotechnol.* **2**: 108–113
- Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC & Beck JS (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **359**: 710–712
- Kudr J, Haddad Y, Richtera L, Heger Z, Cernak M, Adam V & Zitka O (2017) Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications. *Nanomaterials* **7**: 1–29
- Kumar CSSR & Mohammad F (2011) Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**: 789–808
- Kumar Gupta A & Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**: 3995–4021
- Kumar Patra J, Das G, Fernandes Fraceto L, Vangelie Ramos Campos E, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, Armando Diaz-Torres L, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S & Shin H-S (2018) Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **16**: 1–33

- Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, Goswami LN, Bonoiu AC, Bergey EJ, Trampusch KM, Maitra A & Prasad PN (2008) Covalently dye-linked, surface-controlled and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging. *ACS Nano* **2**: 449–456
- 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**: 361–375
- 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
- Lechuga LM (2011) Nanomedicina: Aplicación de la nanotecnología en la salud. *Biotechnol. Apl. a la Salud Humana*
- Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M & Mothes W (2005) Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J. Cell Biol.* **170**: 317–325
- Levy G (1965) Pharmacokinetics of salicylate elimination in man. *J. Pharm. Sci.* **54**: 959–967
- Lidke DS, Lidke KA, Rieger B, Jovin TM & Arndt-jovin DJ (2005) Reaching out respond of activated for signals: Directed by retrograde transport receptors. *J. Cell Biol.* **170**: 619–626
- Lin C, Cheng S, Liao W, Wei P, Sung P, Weng C & Lee C (2012) Mesoporous silica nanoparticles for the improved anticancer efficacy of cis-platin. *Int. J. Pharm.* **429**: 138–147
- Lin W, Huang Y, Zhou X & Ma Y (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **217**: 252–259
- Liu G, Gao J, Ai H & Chen X (2013a) Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small* **9**: 1–13
- Liu G, Molas M, Grossmann GA, Pasumarthi M, Perales JC, Cooper MJ & Hanson RW (2001) Biological properties of Poly-L-Lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.* **276**: 34379–34387
- Liu J, Yu M, Zhou C & Zheng J (2013b) Renal clearable inorganic nanoparticles: A new frontier of bionanotechnology. *Mater. Today* **16**: 477–486
- 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 Y & Qi X (2015) Tumor specific delivery with redox-triggered mesoporous silica nanoparticles inducing neovascularization suppression and vascular normalization. *RSC Adv.* **5**: 55566–55578
- Lu A, Salabas EL & Schüth F (2007) Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Int. Ed. Chemie* **46**: 1222–1244
- Lu J, Liong M, Li Z, Zink JJ & 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
- Madani SY, Mandel A & Seifalian AM (2013) A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev.* **4**: 21521
- Maeda H (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**: 189–207
- Malaterre V, Ogorka J, Loggia N & Gurny R (2009) Oral osmotically driven systems: 30 years of development and clinical use. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **73**: 311–323
- Maleki A & Hamidi M (2016) Nanoarchitected mesoporous silica-based drug-delivery systems: Toward perfect nanomedicine. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* pp 345–377. Elsevier Inc.
- Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W & Duncan R (2000) Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* **65**: 133–148
- Malmsten M, Bysell H & Hansson P (2010) Biomacromolecules in microgels-opportunities and challenges for drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**: 435–444
- Martínez-Carmona M, Lozano D, Colilla M & Vallet-regí M (2018) Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomater.* **65**: 393–404
- Maruyama K, Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Kobayashi S, Tanaka M, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M & Kato H (2015) Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial cells. *Biomed Res. Int.* **2015**: 793186
- Matsumura Y & Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**: 6387–6392
- Mattos JP & Foster A (2011) In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine* **6**: 815–835
- Medeiros NA, Burnette DT & Forscher P (2006) Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* **8**: 215–226
- Mekaru JLH & 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, Liu X, Situ A, Wu B, Ji Z, Chang CH & Nel AE (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**: 3540–3557
- Misra A, Ganesh S & Shahiwala A (2003) Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm. Sci* **6**: 252–273
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**: 779–86

- Moroz P, Jones S & Gray B (2002) Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *Int. J. Hyperth.* **18**: 267–284
- Mothes W, Sherer NM, Jin J & Zhong P (2010) Virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **84**: 8360–8368
- Mustafa AZ (2015) Encapsulation importance in pharmaceutical area, how it is done and issues about herbal extraction. In pp 1–34.
- Nogales E, Kenneth H Downing, Amos LA & Löwe J (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 451–458
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T & Maeda H (1998) Early phase tumor accumulation of macromolecules: A great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn. J. Cancer Res.* **89**: 307–314
- Noriega-Luna B, Godínez LA, Rodríguez FJ, Rodríguez, Rodríguez A, Zaldívar-Lelo De Larrea G, Sosa-Ferreya CF, Mercado-Curiel RF, Manríquez J & Bustos E (2014) Applications of dendrimers in drug delivery agents, diagnosis, therapy, and detection. *J. Nanomater.*: 1–19
- Nosenko MA, Moysenovich AM, Zvartsev R V, Arkhipova AY, Zhdanova AS, Agapov II, Vasilieva T V., Bogush VG, Debabov VG, Nedospasov SA, Moisenovich MM & Drutskaya MS (2018) Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting re-epithelialization and inhibiting fibrosis. *Front. Immunol.* **9**: 2851
- Oh N & Park JH (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* **9**: 51–63
- Ohulchanskyy TY, Roy I, Goswami LN, Chen Y, Bergey EJ, Pandey RK, Oseroff AR & Prasad PN (2007) Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.* **7**: 2835–2842
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W & Jahn-dechent W (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **3**: 1941–1949
- Paris JL, Cabañas MV, Manzano M & Vallet-Regí M (2015) Polymer-grafted mesoporous silica nanoparticles as ultrasound-responsive drug carriers. *ACS Nano* **9**: 11023–11033
- Park K (2014) Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J. Control. Release* **190**: 3–8
- Patidar A & Thakur DS (2011) Dendrimers: potential carriers for drug delivery. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* **4**: 1383–1389
- Pavlik BJ, Hruska EJ, Van Cott KE & Blum PH (2016) Retargeting the Clostridium botulinum C2 toxin to the neuronal cytosol. *Sci. Rep.* **6**: 23707
- 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
- Quignard S, Mosser G, Boissière M & Coradin T (2012) Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* **33**: 4431–4442

- Rennero-Lecuna C, Iturrioz-Rodríguez N, González-Lavado E, Padín-González E, Navarro-Palomares E, Valdivia-Fernández L, García-Hevia L, Fanarraga ML & González-Legarreta L (2019) Effect of size, shape, and composition on the interaction of different nanomaterials with HeLa cells. *J. Nanomater.*: 1–11
- Riley RS & Day ES (2017) Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* **9**: 1–16
- 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
- Rodríguez BS (2014) Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica.
- Rodríguez-Fernández L, Valiente R, Gonzalez 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
- Rosen H & Abribat T (2005) The rise and rise of drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 381–385
- Rosenholm JM, Sahlgren C & Lindén M (2011) Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr. Drugs Targets* **12**: 1166–1186
- Rubio L, Yamani N El, Kazimirova A, Dusinska M & Marcos R (2016) Multi-walled carbon nanotubes (NM401) induce ROS-mediated HPRT mutations in Chinese hamster lung fibroblasts. *Environ. Res.* **146**: 185–190
- Russier J, Oudjedi L, Piponnier M, Bussy C, Prato M, Kostarelos K, Lounis B, Bianco A & Cognet L (2017) Direct visualization of carbon nanotube degradation in primary cells by photothermal imaging. *Nanoscale* **9**: 4642–4645
- Schelhaas M, Ewers H, Rajamäki M-L, Day PM, Schiller JT & Helenius A (2008) Human papillomavirus type 16 entry: retrograde cell surface transport along actin-rich protrusions. *Plos Pathog.* **4**: e1000148
- 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
- Seyfoori A, Koshkaki MR & Majidzadesh-A K (2016) Microgels: A new approach in cancer therapy. In *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* pp 3–31. Elsevier Inc.
- Sherer NM, Jin J & Mothes W (2010) Directional spread of surface-associated retroviruses regulated by differential virus-cell interactions. *J. Virol.* **84**: 3248–3258
- Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-soto LF, Horensavitz C, Pypaert M & Mothes W (2007) Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat. Cell Biol.* **9**: 310–315
- Shi Y, Helary C, Haye B & Coradin T (2017) Extracellular vs. intracellular degradation of nanostructured silica particles. *Langmuir* **34**: 406–415
- Shimmin RG, Schoch AB & Braun P V (2004) Polymer size and concentration effects on

- the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols. *Langmuir* **20**: 5613–5620
- Singh N, Joshi A, Toor AP & Verma G (2017) Drug delivery: Advancements and challenges. In *Nanostructures for Drug Delivery* pp 865–886. Elsevier Inc.
- Singh R & Jr JWL (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* **86**: 215–223
- Slowing II, Trewyn BG & Lin VS (2007) Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *JACS* **129**: 8845–8849
- Slowing II, Vivero-escoto JL, Wu C & Lin VS (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**: 1278–1288
- Slowing II, Vivero-Escoto JL, Zhao Y, Kandel K, Peeraphatdit C, Trewyn BG & Lin VSY (2011) Exocytosis of mesoporous silica nanoparticles from mammalian cells: From asymmetric cell-to-cell transfer to protein harvesting. *Small* **7**: 1526–1532
- Smith JL, Lidke DS & Ozbun MA (2008) Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. *Virology* **381**: 16–21
- Song Y, Li Y, Xu Q & Liu Z (2017) Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: Advances, challenges, and outlook. *Int. J. Nanomedicine* **12**: 87–110
- Stober W & Fink A (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**: 62–69
- Strebhardt K & Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev.* **8**: 473–480
- Sugiyama Y (1996) Importance of pharmacokinetic considerations in the development of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **19**: 333–334
- Sukhorukov GB, Donath E, Lichtenfeld H, Knippel E, Knippel M, Budde A & Möhwald H (1998) Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surfaces A* **137**: 253–266
- Sultana F, Arafat M & Sharmin S (2013) An overview of nanogel drug delivery system. *J. Appl. Pharm. Sci.* **3**: S95–S105
- Sun B, Wang X, Ji Z, Wang M & Liao Y (2015) NADPH oxidase-dependent NLRP3 inflammasome activation and its important role in lung fibrosis by multiwalled carbon nanotubes. *Small* **11**: 2087–97
- Sun L, Zhang X, An J, Su C, Guo Q & Li C (2014) Boronate ester bond-based core-shell nanocarriers with pH response for anticancer drug delivery. *RSC Adv.* **4**: 20208–20215
- Szycher M (1986) Controlled drug delivery: A critical review. *J. Biomater. Appl.* **1**: 171–182
- Tan L, Yang M, Wu H, Tang Z, Xiao J, Liu C & Zhuo R (2015) Glucose- and pH-responsive nanogated ensemble based on polymeric network capped mesoporous silica. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**: 6310–6316
- Tang F, Li L & Chen D (2012) Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv. Mater.* **24**: 1504–1534
- Tang Z, Zhou Y, Sun H, Li D & Zhou S (2014) Biodegradable magnetic calcium phosphate

- nanoformulation for cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**: 90–100
- Taniguchi N (1974) On the basic concept of nano-technology. *Proc. Intl. Conf. Prod. London, 1974*
- Theeuwes F (1975) Elementary osmotic pump. *J. Pharm. Sci.* **64**: 1987–1991
- Theeuwes F & Higuchi T (1972) Osmatic dispensing device for releasing beneficial agent.
- Theeuwes F, Swanson D, Wong P, Bosen P, Place V, Heimlich K & Kwan KC (1983) Elementary osmotic pump for indomethacin. *J. Pharm. Sci.* **72**: 253–258
- Tiitta S, Duchanoy A, Li L & Heino J (2013) Intracellular degradation of multilabeled poly(Ethylene imine)-mesoporous silica-silica nanoparticles: Implications for drug release. *Mol. Pharm.* **10**: 1795–1803
- Tolle C, Riedel J, Mikolai C, Winkel A, Stiesch M, Wirth D & Menzel H (2018) Biocompatible coatings from smart biopolymer nanoparticles for enzymatically induced drug release. *Biomolecules* **8**: 1–20
- Treacy MMJ, Ebbesen TW & Gibson JM (1996) Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* **381**: 678–680
- Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I & Manzano M (2018) Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights. *Molecules* **23**: 47
- Vangijzegem T, Stanicki D & Laurent S (2019) Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **1**: 69–78
- Vermeulen K, Bockstaele DR Van & Berneman ZN (2003) The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**: 131–149
- Vizirianakis IS (2011) Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **7**: 11–17
- Vogt C, Toprak MS, Muhammed M, Laurent S, Bridot J-L & Müller RN (2010) High quality and tuneable silica shell-magnetic core nanoparticles. *J Nanopart Res* **12**: 1137–1147
- Waley SG & Watson J (1953) The action of trypsin on polylysine. *Biochem J* **55**: 328–337
- Wan Y & Zhao D (2007) On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chem. Rev.* **107**: 2821–2860
- Wang D, Lin Z, Wang T, Yao Z, Qin M, Zheng S & Lu W (2016) Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *J. Hazard. Mater.* **308**: 328–334
- Wang Z, Johns VK & Liao Y (2014) Controlled release of fragrant molecules with visible light. *Chem. Eur. J.* **20**: 1–5
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science.* **123**: 309–314
- Warner WR (1902) The sugar coated pill. *Am. J. Pharm* **74**: 32
- Weisenberg RC. (1972) Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science.* **177**: 1104–1105
- Westmeier D, Chen C, Stauber RH & Docter D (2015) The bio-corona and its impact on nanomaterial toxicity. *Eur. J. Nanomed.* **7**: 153–168

- Wu S & Butt H-J (2016) Near-infrared-sensitive materials based on upconverting nanoparticles. *Adv. Mater.* **28**: 1208–1226
- Wu TT & Zhou SH (2015) Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. *Int. J. Med. Sci.* **12**: 187–200
- Yanagisawa T, Shimizu T, Kuroda K & Kato C (1990) The preparation of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63**: 988–992
- Yang Q, Jacobs TM, McCallen JD, Moore DT, Huckaby JT, Edelstein J & Lai SK (2016) Analysis of pre-existing IgG and IgM antibodies against polyethylene glycol (PEG) in the general population. *Anal. Chem.* **88**: 11804–11812
- Yokoyama M (2005) Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J. Artif. Organs* **8**: 77–84
- Zaffaroni A (1974) Bandage for the administration of drug by controlled metering through microporous materials.
- Zhai W, He C, Wu L, Zhou Y, Chen H & Chang J (2012) Degradation of hollow mesoporous silica nanoparticles in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **100B**: 1397–1403
- Zhang J, Niemelä M, Westermarck J & Rosenholm JM (2014) Mesoporous silica nanoparticles with redoxresponsive surface linkers for charge-reversible loading and release of short oligonucleotide. *Dalt. Trans.* **43**: 4115–4126
- Zhang M, Jia L, Ying K, Qilin L, Zheng D-W, Song Q, Chen H, Chen X, Xu Y, Li C & Jiang B (2017) Ingenious pH-sensitive dextran/mesoporous silica nanoparticles based drug delivery systems for controlled intracellular drug release. *Int. J. Biol. Macromol.* **98**: 691–700
- Zhang T, Ge J, Hu Y, Zhang Q, Aloni S & Yin Y (2008) Formation of hollow silica colloids through a spontaneous dissolution-regrowth process. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**: 5806–5811
- Zhao D, Alizadeh D, Zhang L, Liu W, Farrukh O, Manuel E, Diamond DJ & Badie B (2011) Carbon nanotubes enhance CpG uptake and potentiate antiglioma immunity. *Cancer Ther. Preclin.* **17**: 771–783
- Zhu J & Shi X (2013) Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications. *J. Mater. Chem. B* **1**: 199–211

VII. Artículos

- **Iturrioz-Rodríguez N**, Correa-Duarte MA, Fanarraga ML (2019) Controlled drug delivery systems for cancer based on mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. *In press*
- Renero-Lecuna C, **Iturrioz-Rodríguez N**, González-Lavado E, Padín-González E, Navarro-Palomares E, Valdivia-Fernández L, García-Hevia L, Fanarraga ML, González-Legarreta L (2019) Effect of size, shape, and composition on the interaction of different nanomaterials with HeLa cells. *Journal of Nanomaterials*. 28:1-11
- González-Lavado E, **Iturrioz-Rodríguez N**, Padín-González E, González J, García-Hevia L, Heuts J, Pesquera C, González F, Villegas JC, Valiente R & Fanarraga ML (2018) Biodegradable multi-walled carbon nanotubes trigger anti-tumoral effects. *Nanoscale* 10: 11013-11020
- **Iturrioz-Rodríguez N***, González-Domínguez E*, González-Lavado E, Marín-Caba L, Vaz B, Pérez-Lorenzo M, Correa-Duarte MA & Fanarraga ML (2017) A Biomimetic Escape Strategy for Cytoplasm Invasion by Synthetic Particles. *Angew. Int. Ed. Chemie* 56: 13736–13740
- González-Domínguez E*, **Iturrioz-Rodríguez N***, Padín-González E, Villegas J, García-Hevia L, Pérez-Lorenzo M, Parak WJ, Correa-Duarte MA & Fanarraga ML (2017) Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible. *International Journal of Nanomedicine* 12: 6317–6328

Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
29 August 2017
Number of times this article has been viewed

Elena González-Domínguez^{1,*}
Nerea Iturrioz-Rodríguez^{2,*}
Esperanza Padín-González²
Juan Villegas²
Lorena García-Hevia²
Moisés Pérez-Lorenzo¹
Wolfgang J Parak³
Miguel A Correa-Duarte^{1,*}
Mónica L Fanarraga^{2,*}

¹Department of Physical Chemistry, Biomedical Research Center (CINBIO), Southern Galicia Institute of Health Research (IISG), Biomedical Research Networking Center for Mental Health (CIBERSAM), Universidade de Vigo, Vigo, Spain; ²Nanomedicine Group, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain; ³Department of Physics, Philipps Universität Marburg, Marburg, Germany

*These authors contributed equally to this work

Abstract: Carbon nanotubes (CNTs) are likely to transform the therapeutic and diagnostic fields in biomedicine during the coming years. However, the fragmented vision of their side effects and toxicity in humans has proscribed their use as nanomedicines. Most studies agree that biocompatibility depends on the state of aggregation/dispersion of CNTs under physiological conditions, but conclusions are confusing so far. This study designs an experimental setup to investigate the cytotoxic effect of individualized multiwalled CNTs compared to that of identical nanotubes assembled on submicrometric structures. Our results demonstrate how CNT cytotoxicity is directly dependent on the nanotube dispersion at a given dosage. When CNTs are gathered onto silica templates, they do not interfere with cell proliferation or survival becoming highly compatible. These results support the hypothesis that CNT cytotoxicity is due to the biomimetics of these nanomaterials with the intracellular nanofilaments. These findings provide major clues for the development of innocuous CNT-containing nanodevices and nanomedicines.

Keywords: MWCNTs, biomimetics, cytoskeleton, microtubules, apoptosis, migration, proliferation

Introduction

In the past years, carbon nanotubes (CNTs) have emerged as promising materials in nanomedicine. Their unique structure-dependent properties have shown enormous potential in the design of groundbreaking tools in many different biological fields including biosensing, tissue engineering, intracellular probing, cancer therapy, nano-delivery, and bioimaging.¹⁻⁵ Paradoxically, although no human pathology has been documented because of CNT exposure so far, their asbestos-like morphology and bio-persistence have relapsed their application in nanomedicine.

At the cellular level, there is ample information regarding CNT toxicity. These nanomaterials have been reported to produce a plethora of effects in many cell types including 1) genotoxic responses and DNA breakage,⁶⁻¹¹ 2) chromosomal malsegregation,¹¹⁻¹⁴ 3) oxidative stress,¹⁵⁻¹⁸ 4) frustrated phagocytosis,¹⁹⁻²³ 5) biomechanical failure,^{18,24-26} and mitochondrial damage.^{27,28} However, these results contrast with many other reports claiming CNTs as biocompatible in different biological systems.²⁹⁻³⁵ This confusing scenario is the result of many different issues.

As reviewed by Marchesan et al,³⁶ CNTs represent a highly heterogeneous type of nanomaterials that mainly differ in 1) their sizes – with diameters ranging from <1 nm up to 100 nm, 2) their lengths – that typically vary from a few hundred nanometers to several microns, 3) their purity – containing metal residues that may be present as traces

Correspondence: Mónica L Fanarraga
Grupo de Nanomedicina, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
Email fanarraga@unican.es

or up to 30% in weight, and 4) their surface properties – that are strongly dependent on the surface functionalization, with all these factors being critical in the cellular response.^{22,23,28,31,37} In addition to the heterogeneity of the startup material, many experimental toxicity assays have been performed following traditional *in vitro* approaches designed for soluble chemicals.³⁸ Unlike these, nanomaterials in general, and CNTs in particular, have a high surface-to-volume ratio, so they often aggregate and sediment. In addition, as the state of aggregation of CNTs in biological aqueous-based environments is critical in mitochondrial proapoptotic protein activation and reactive oxygen species production,²⁸ CNT dispersion adds extra experimental variables to toxicological studies.

To this effect, nanodispersed CNTs have been reported to trigger two major different phenotypes that include chromosomal breakage (clastogenic effects)^{6–10} and cytoskeletal incompetence,^{12,13,18,24–26} and both can be attributed to the biomimetic properties of CNTs with the intracellular nanofilaments, namely DNA and microtubules. Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) in particular share many properties with microtubules including 1) their tubular shape, 2) lengths, 3) resiliency, 4) and reactive surfaces,³⁹ which prompt their interaction *in vitro*⁴⁰ and *in vivo*.¹⁴ The biosynthetic polymers assembled are moderately functional,⁴⁰ but highly stable compared to standard microtubules that typically undergo continuous polymerization/depolymerization cycles in the cell.⁴¹ The cytoskeletal stability induced by CNT exposure leads to the disassembly of the microtubule nucleation center, known as the centrosome, triggering the disorganization of the typically radial microtubule array.²⁶ This effect produces serious biomechanical defects in ~72 h, frustrating cell migration and division and eventually killing the cell.^{14,18} This cytotoxic effect has been reported for different cell types including fibroblasts,⁴² HeLa,²⁶ microglia,⁴³ melanoma,⁴⁴ or glioblastoma²⁶ cells, producing interesting *in vivo* antitumoral effects.⁴⁴

Here we investigate the intrinsic cytotoxicity of CNTs, disconnecting the biomimetic effect from other possible toxicity mechanisms attributed to their composition or physicochemical properties. To perform such studies, we have investigated the cellular response after exposure to well-dispersed CNTs versus controlled assemblies of identical nanotubes. The CNT-bearing structures, key issue in this study, have been obtained by means of the controlled deposition of CNTs onto spherical silica colloids.

Materials and methods

Chemicals and media

Rhodamine B isothiocyanate (70% labeling efficiency), (3-aminopropyl) triethoxysilane (97%),

4-(dimethylamino)pyridine ($\geq 99\%$), dicyclohexylcarbodiimide solution ($\geq 99\%$), triethylamine BioUltra $\geq 99.5\%$, poly(diallyldimethylammonium chloride) (MW <100,000 Da), poly-(sodium 4 styrenesulfonate) (MW =70,000 Da), nitric acid (HNO₃, 65%), sodium hydroxide (NaOH, $\geq 97\%$), tetraethyl orthosilicate (TEOS, 98%), and EtOH were obtained from Sigma-Aldrich Química SL (Madrid, Spain). Multiwalled carbon nanotubes 9.5 nm in diameter and 1.5 μm in length, 95% C purity, synthesized using Catalytic Chemical Vapor Deposition process, were purchased from Nanocyl as a powder. Ammonium hydroxide solution (NH₄OH, 28%–30% NH₃), cystamine hydrochloride 97%, N,N-dimethylformamide were obtained from Fluka. Sulfuric acid (H₂SO₄, 96%) was purchased from Panreac and sodium chloride (NaCl, $\geq 99\%$) from Merck.

Synthesis and characterization of the CNT-bearing structures

Monodisperse silica spheres (~500 nm) were prepared using a modified Stöber method (Figure S1). Typically, a tetraethyl orthosilicate (TEOS) solution (1.7 mL, 98%) was added to a solution containing ammonium hydroxide (1.97 mL, 28%–30% NH₃), water (3.1 mL), and ethanol (18.2 mL), stirring at room temperature for 2 h. The excess of reagents was removed by three centrifugation/redispersion cycles with ethanol (9,000 rpm, 10 min). Particles were finally redispersed and stored in water. Silica particles were functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APS) by means of the addition of 0.25 mL of APS in 5 mL of an ethanolic dispersion of SiO₂ (8.7 mg/mL). After a 3-h stirring, the excess of reagents was removed by three repeated centrifugation/redispersion cycles with ethanol (7,000 rpm, 20 min). Then, the APS-functionalized SiO₂ particles were diluted in 10 mL of EtOH and added to 10 mL of an ethanolic solution of rhodamine B isothiocyanate (RBITC) (0.32 mg/mL). After a 3-h stirring, the excess of dye was removed by three repeated centrifugation/redispersion cycles (7,000 rpm, 20 min), affording an aqueous solution of fluorescent-labeled silica particles (*f*-SiO₂). CNT functionalization was performed using MWCNTs pretreated with acetone and ethanol to remove organic materials, frozen with N₂ and lyophilized. Then, 100 mg of the purified MWCNTs was oxidized by sonication in 100 mL of a mixture of H₂SO₄/HNO₃ (3:1) for 15 min with an ultrasonic probe (20 W) and 4 h in an ultrasonic bath. Then, the sample was washed with an NaOH aqueous solution by three centrifugation/redispersion cycles (13,000 rpm, 4 h). Upon stabilization of pH at 10, the sample was sonicated with the tip sonicator for 2 h. Then, the MWCNTs were washed with water by three centrifugation/redispersion cycles (13,000 rpm, 8 h). Finally, a stable dispersion

(1.54 mg/mL) of oxidized MWCNTs (ox-MWCNTs) exhibiting a negative surface charge was obtained. Then, the ox-MWCNTs were assembled onto the labeled silica spheres. With this aim, the positively charged *f*-SiO₂ nanoparticles (zeta potential = +40 mV) were functionalized by successive depositions of oppositely charged polyelectrolytes (poly-(sodium 4 styrenesulfonate)/poly(diallyldimethylammonium chloride)) giving rise to a positively charged surface. The deposition of the different polymers was performed following the same protocol. *f*-SiO₂ spheres were added to a polymer solution (1 mg/mL, 0.5 M NaCl) under weak sonication for 1 h. The excess of polymer was removed by three centrifugation/redispersion cycles (20 min, 8,000 rpm). Then, 2 mL of an aqueous solution of NaCl (0.5 M) and 3 mL of an aqueous dispersion of ox-MWCNTs (1.54 mg/mL) were added to 100 mL of the positively charged *f*-SiO₂ nanoparticles (0.87 mg/mL) and mixed under stirring for 15 h. Finally, the excess of MWCNTs was removed by three repeated centrifugation/redispersion cycles (7,000 rpm, 20 min), and the MWCNT-coated *f*-SiO₂ spheres were dispersed in water (3.8 mg/mL with an *f*-SiO₂:MWCNT wt. 22:1). The concentration of MWCNTs deposited onto the *f*-SiO₂ nanoparticles was calculated by measuring the difference between the initial amount of nanotubes and that obtained in the supernatant of the centrifugation-washing step. The characterization of these composites was performed using transmission electron microscopy (TEM).

Cell culture, labeling, and microscopy imaging

HeLa cells (from the European Molecular Biology Laboratory Cell Bank) were cultured under standard conditions in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% serum and containing antibiotics (from Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were incubated with 2–4 µg/mL of particles (unless otherwise indicated in the text) resuspended and functionalized by mild sonication in standard tissue culture medium containing serum. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde. Microtubules were immunolabeled with the anti- α -tubulin (B512) (Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, Spain) antibody that was recognized by a secondary goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate and Hoechst dye (Bisbenzimidazole) (both from Sigma-Aldrich Química SL) were used to stain actin and DNA, respectively. Confocal microscopy images were obtained with a Nikon A1R confocal microscope and were processed with the NIS-Elements Advanced Research software. High-resolution confocal imaging was performed using a Plan Apochromatic

100× oil numerical aperture 1.45 objective. All confocal cell images are pseudocolored. Live-cell phase-contrast imaging was performed on a live-cell Nikon-Ti live-cell station. TEM was also used to localize intracellular the CNT-bearing particles (CNPs) in pelleted HeLa cells fixed with 1% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer, washed in 0.12 M phosphate buffer, postfixed in 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated, embedded in Araldite, and stained with lead citrate–uranyl acetate. Araldite sections (ca. 70 nm) were observed using a JEOL JEM 1011 microscope.

Particle quantification, live-cell assessment, and statistical analysis

Particle quantification was performed on random 20× magnification fluorescent images of the HeLa cell cultures. The Image-J software was used for random automatic quantification of extracellular versus intracellular particles. The total number of intracellular particles after overnight incubation was considered a 100%. The Student's *t*-test was used to perform the statistical analysis and to evaluate significance. Cell death was identified and quantified using a standard Trypan blue exclusion assay. Cell proliferation blockage was performed using flow cytometry in a total of ca. 10,000 fixed and stained HeLa cells (per condition) in a Becton Dickinson FACS CantoII equipment. Data were analyzed using the FACS Diva software (Becton Dickinson, NJ, USA).

Microtubule depolymerization–repolymerization experiments

This assay was performed as previously described¹⁴ following classical protocols.⁴⁵ The microtubule tubulin polymer disassembles under low-temperature conditions (4°C, 30 min), repolymerizing in minutes under permissive temperatures (37°C). Microtubule depolymerization was performed with culture medium at 4°C, containing 2 µM nocodazole for 30 min. Microtubule regrowth was performed placing coverslips into fresh media at 37°C and cells were snap fixed in 1% glutaraldehyde at the indicated times.

Results CNP design

The synthesis of uniform CNPs was carried out following the approach depicted in Figure 1. In a first step (Figure 1AI) SiO₂ particles of ca. 500 nm were functionalized with RBITC, a fluorescence label that allows confocal microscopy intracellular particle tracking. The electrostatic deposition of negatively charged oxidized nanotubes onto fluorescence silica colloids (*f*-SiO₂) was performed as previously described

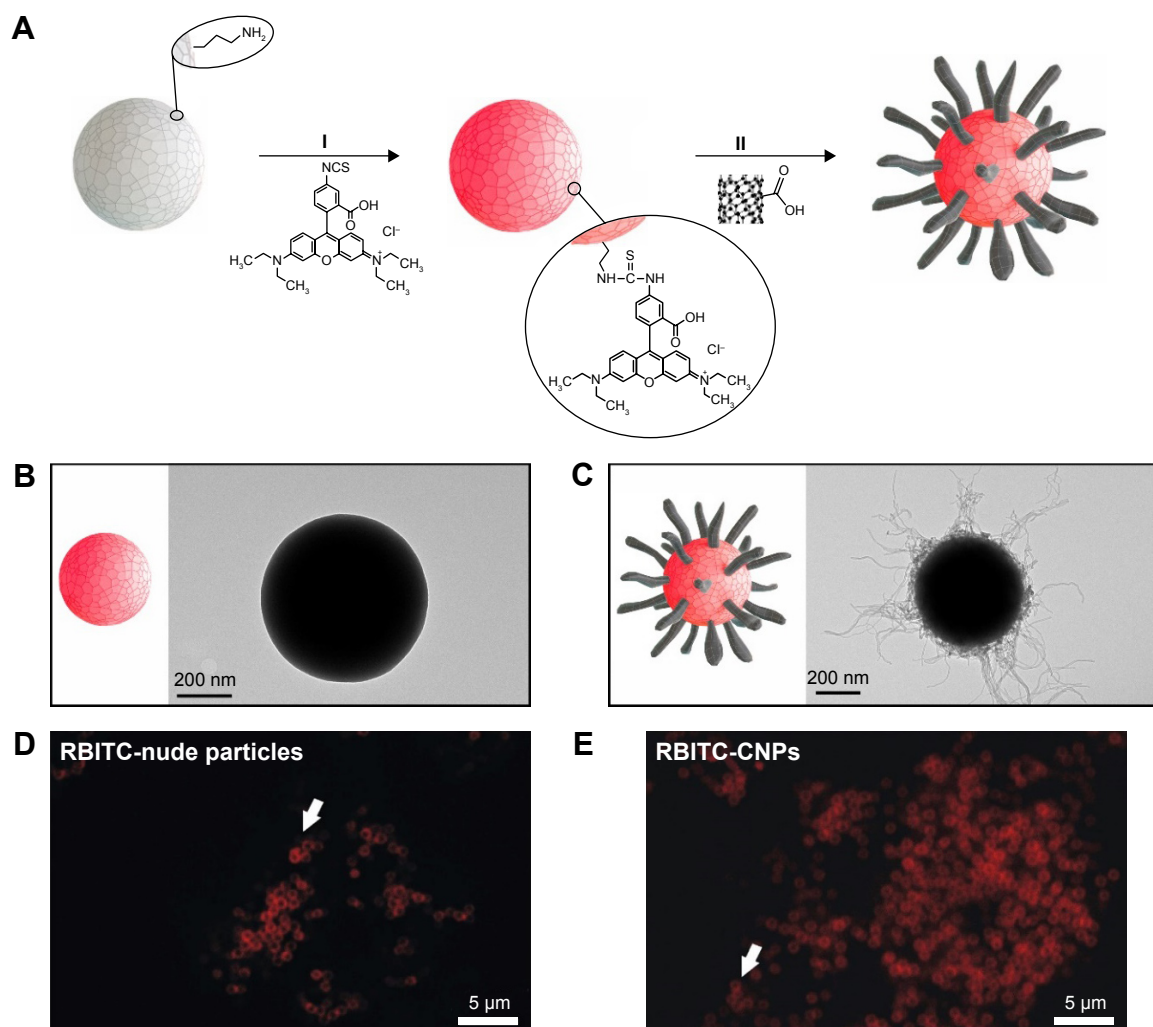


Figure 1 Diagram of the fabrication process of the fluorescent CNPs.

Notes: (A) Sequential synthetic steps: (I) fluorescent labeling of the SiO_2 particles ($f\text{-SiO}_2$), and (II) deposition of CNTs onto the $f\text{-SiO}_2$ spheres (CNP). TEM images of (B) $f\text{-SiO}_2$ particles and (C) CNPs. Confocal microscopy image of the RBITC fluorescence on $f\text{-SiO}_2$ particles (D) and (E) CNPs in buffered culture medium. Arrows point to individual particles in single Z-plane confocal images.

Abbreviations: CNP, CNT-bearing particle; CNTs, carbon nanotubes; $f\text{-SiO}_2$, fluorescent-labeled silica particles; RBITC, rhodamine B isothiocyanate; TEM, transmission electron microscopy.

(Figure 1AII, see “Materials and methods”).^{46–48} Figure 1B shows representative TEM images of the $f\text{-SiO}_2$ particles used as uncoated controls, while Figure 1C shows the CNPs synthesized herein, as uniform and controlled assemblies of nanotubes. All these structures were finally coated with adsorbed serum proteins so they could be recognized by different cell-surface receptors on the cell membrane of HeLa cells, triggering receptor-mediated endocytosis as described for MWCNTs.^{49,50}

CNP engulfment by HeLa cells

Particle engulfment was investigated using time-lapse video microscopy (Video S1). Endocytosis started a few minutes after the CNPs landed on the cell surface with ca. 50% of

the particles being intracellular 2 h after the addition of the CNPs in the culture medium (Figure 2). The intracellular distribution of the CNPs was determined using confocal microscopy imaging at different time points. CNP accumulation was significant in the vicinities of the nucleus, at the pericentrosomal region, 72–96 h after particle exposure. On the contrary to MWCNTs exposure, tubulin immunostaining revealed an intact microtubule cytoskeleton, irradiating from a well-organized centrosome (Figure 2B, arrows).

Further characterization of the CNP–cellular contact and the study of the intracellular fate of these particles was performed by TEM analysis. Figure 3 shows different steps in particle engulfment. First, the CNTs on the surface of the CNPs contact the HeLa surface, being eventually trapped

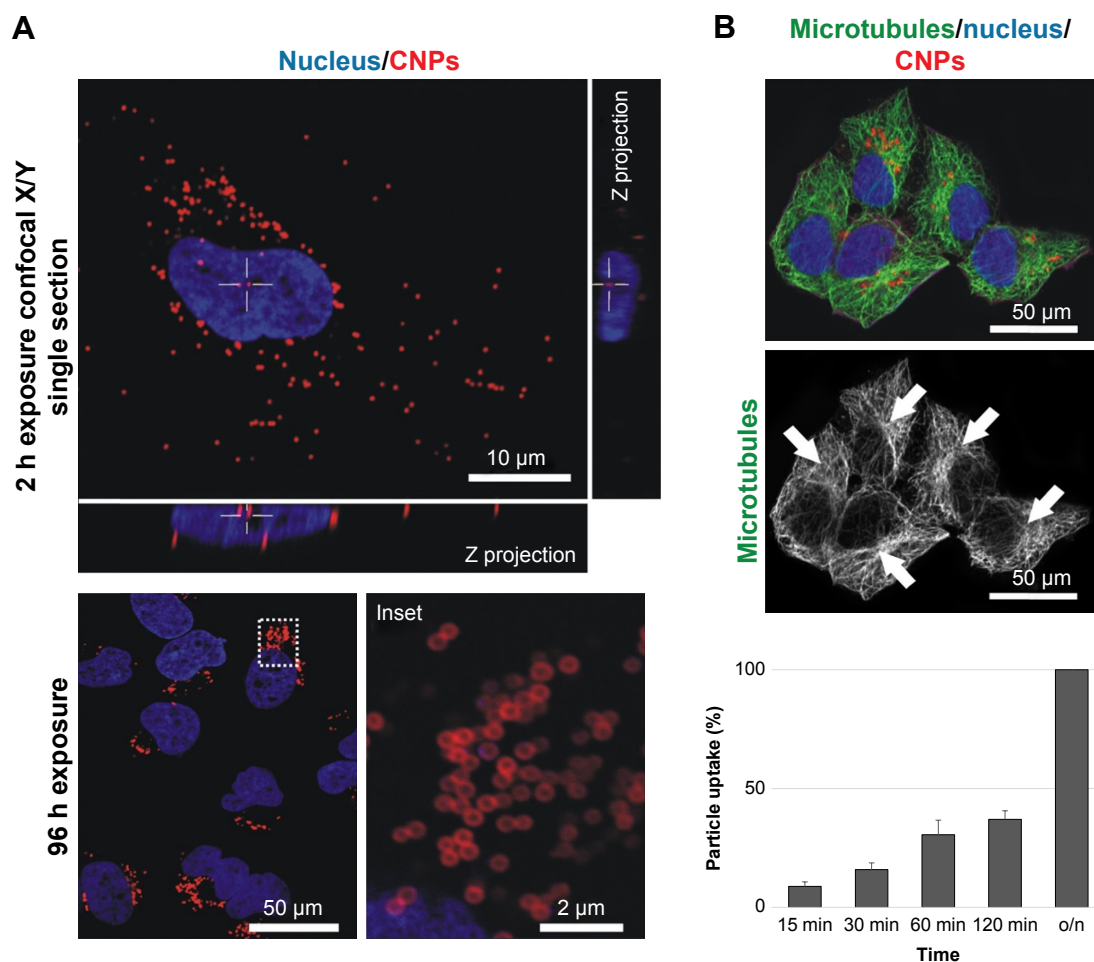


Figure 2 CNP cellular uptake and intracellular distribution.

Notes: (A) Confocal microscopy image of HeLa cells containing intracellular CNPs at 2 and 96 h. The white cross (also visible in the lateral projections) indicates the position of a cytoplasmic particle (red channel) 2 h after exposure. CNPs accumulate at the centrosomal region of the cells 96 h after initial contact (inset). (B) Confocal microscopy projection image of HeLa cells containing fluorescent CNPs displaying no abnormalities in the microtubule cytoskeleton. These tubulin nanofilaments irradiate from well-organized centrosomes (arrows). Cell nuclei (blue channel) of cells exposed to CNPs present a healthy appearance.

Abbreviations: CNP, CNT-bearing particle; CNTs, carbon nanotubes; o/n, overnight.

inside endocytic membranes. The CNT-based coating surrounding the silica templates can be clearly visualized inside the endocytic vesicles (Figure 3, arrows). HeLa cells exposed to CNPs during 72 h presented many particles localized inside the cytosol with their CNT coerture fully integrated in the surrounding cytoplasm, and no visible surrounding membranes. All these experiments support the idea that the entry of CNPs inside HeLa cells is similar to that described for dispersed CNTs.^{49,50}

CNTs attached to templates are not cytotoxic

Well-dispersed CNTs, and more particularly MWCNTs, trigger significant microtubule cytoskeleton disrupting effects that lead to antiproliferative effects and cell death in different cell types. Here we compare the effects of CNTs delivered

to the cells in two different formats. On one hand, we exposed HeLa cells to fully dispersed one-dimensional (1D) functionalized CNTs as in previous studies.¹⁴ On the other hand, cells were exposed to functionalized CNPs containing comparable amounts of CNTs attached to their surfaces. Cells were grown in the presence of these nanomaterials for 72 h before morphological and cell viability evaluation.

As previously reported,^{14,26,51} cells exposed to dispersed CNTs displayed a disorganized microtubule cytoskeleton with no detectable centrosomes and a reorganized actin cortex (Figure 4). Cell death quantification using the Trypan blue exclusion test revealed that exposure to dispersed CNTs triggered a reduction of ca. 6.5% cell viability during the first 48–72 h, thus coinciding with published observations.^{14,52}

On the contrary, HeLa cells exposed to CNPs containing identical amounts of CNTs attached to their surfaces displayed

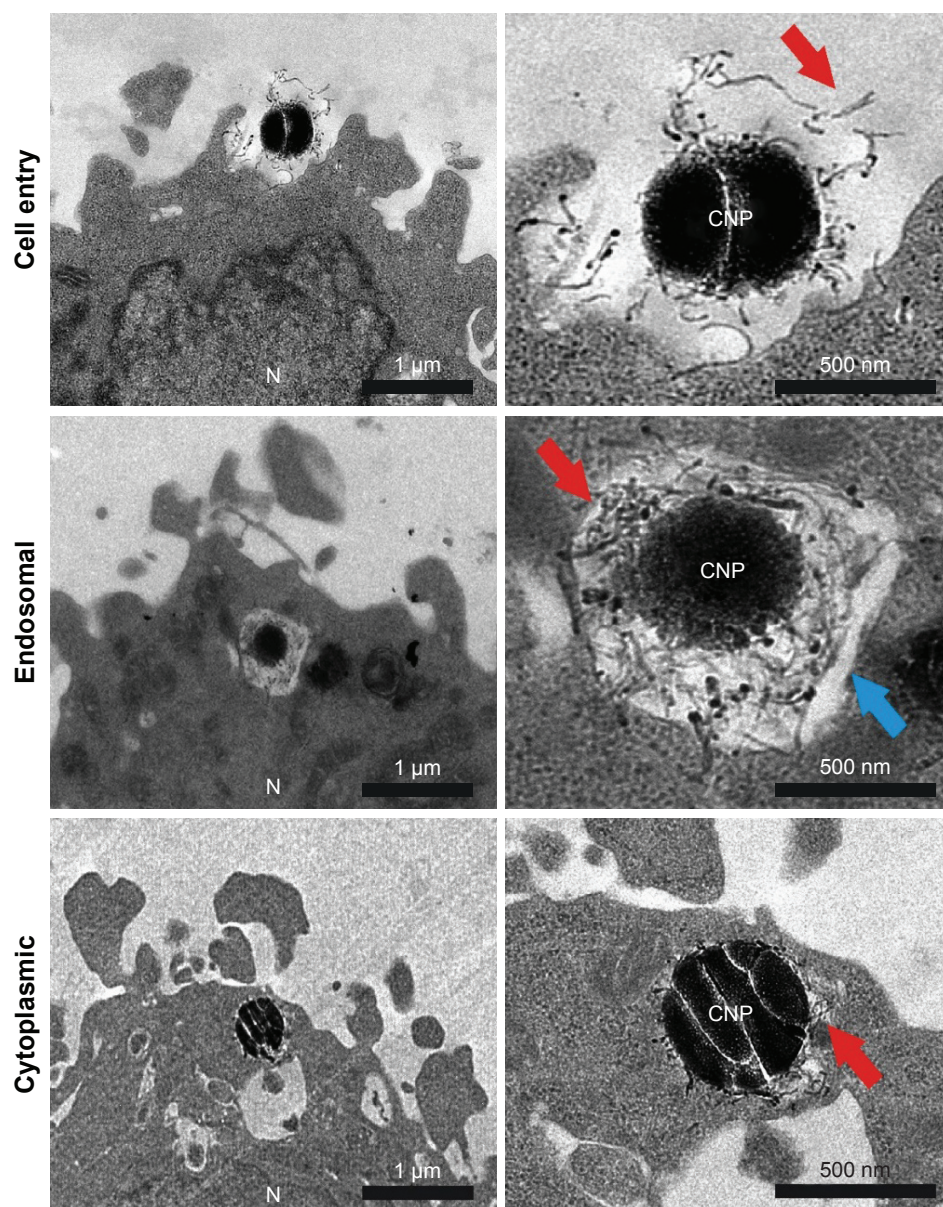


Figure 3 TEM imaging of resin section of HeLa cells exposed to CNPs.

Notes: CNP initial contact is CNT-mediated. The endocytic membranes are observed in some particles, presumably after endocytosis. Some particles also appear devoid of membranes, inside the cytoplasm. Red and blue arrows point at the CNTs attached on the surface of the CNPs and endosomal membrane, respectively. The nucleus (N) is also labeled.

Abbreviations: CNP, CNT-bearing particle; CNT, carbon nanotube; TEM, transmission electron microscopy.

a well-organized cytoskeleton, with a visible centrosome and nonreactive actin microfilaments on the cellular cortex despite the large number of CNPs per cell (>100 particles/cell) (Figure 4A, arrows). Interestingly, cells exposed to CNPs displayed identical survival rates to cells exposed to f -SiO₂ particles or untreated controls (Figure 4B).

To investigate if intracellular CNPs interfered in cell division, we quantified cells at the different proliferation cycle stages using flow cytometry in a total population of $\sim 10,000$ cells per condition. As expected, cells treated

with dispersed CNTs displayed a severe dosage-dependent proliferative blockage in G2 (Figure 5A) just as previously reported. Conversely, cells exposed to CNPs displayed no detectable cell-cycle defects, dividing normally. Confocal microscopy morphological assessment of the proliferating cells in these cultures revealed normal bipolar spindle assemblies in cells exposed to CNPs that contrasted to the large collection of spindle abnormalities observed in cells exposed to dispersed CNTs. These aberrations included apolar, tripolar, or multipolar spindles,

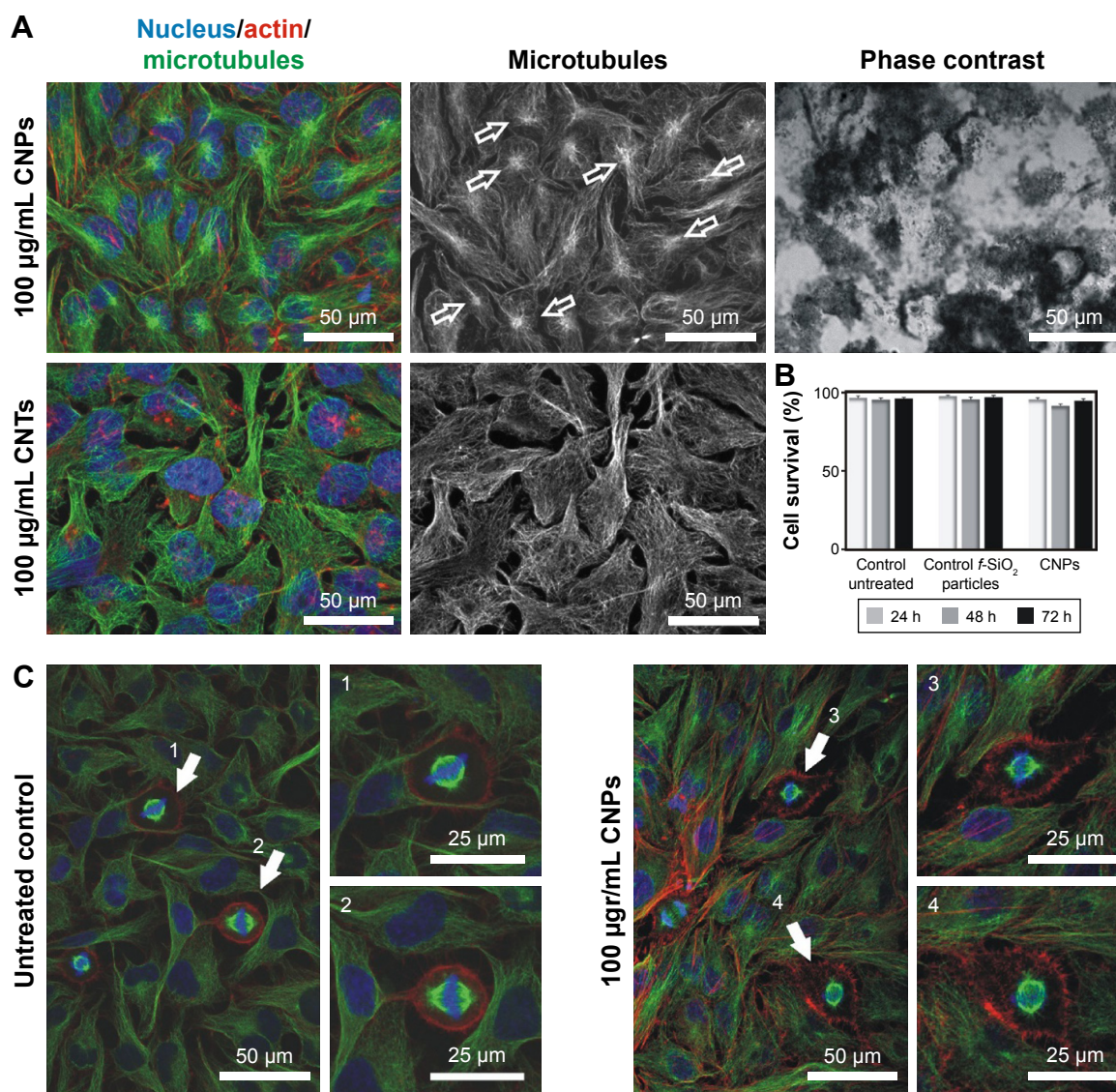


Figure 4 CNPs are highly biocompatible.

Notes: (A) Confocal microscopy images of the intracellular nanofilaments in interphase cells treated with CNPs (top) or CNTs (bottom) for 72 h. CNP-treated cells display a well-organized radial cytoskeleton with visible centrosomes (green channel, empty arrows). On the contrary, cells exposed to CNTs show a typically disorganized microtubule cytoskeleton displaying no visible centrosomes and a reactive actin cortex (red channel). (B) CNP-treated cells display a survival rate comparable to controls. (C) Control and HeLa cell cultures exposed to CNPs for 72 h. CNP-treated cells display well-assembled spindles (3, 4) compared to untreated control cells (1, 2). Dying cells were not detected.

Abbreviations: CNPs, CNT-bearing particles; CNTs, carbon nanotubes.

accompanied by many apoptotic figures (Figure 5B). In summary, we observed no obvious cytotoxic or proliferative effects in cells treated with CNTs attached to silica templates. These results stress the importance of the dispersion of CNTs in cytotoxicity.

CNTs gathered on CNPs do not nucleate tubulin or actin nanofilaments

Tubulin and, to a lesser extent, actin have shown biomimetic properties with MWCNTs. To explore if these features are maintained when CNTs are gathered onto CNPs, we

investigated tubulin and actin polymer nucleation on these templates following previous protocols¹⁴ that reproduced classical microtubule depolymerization–repolymerization experiments⁴⁵ on live cells containing 5–15 particles/cell (“Materials and methods”). This procedure allowed to investigate if grouped CNTs could nucleate tubulin polymers ectopically, behaving as “artificial” centrosomes.

Figure 6 shows high-resolution confocal microscopy images of cells where microtubule ectopic nucleation sites coinciding with the CNPs were not detected after depolymerization–repolymerization. Actin recruitment

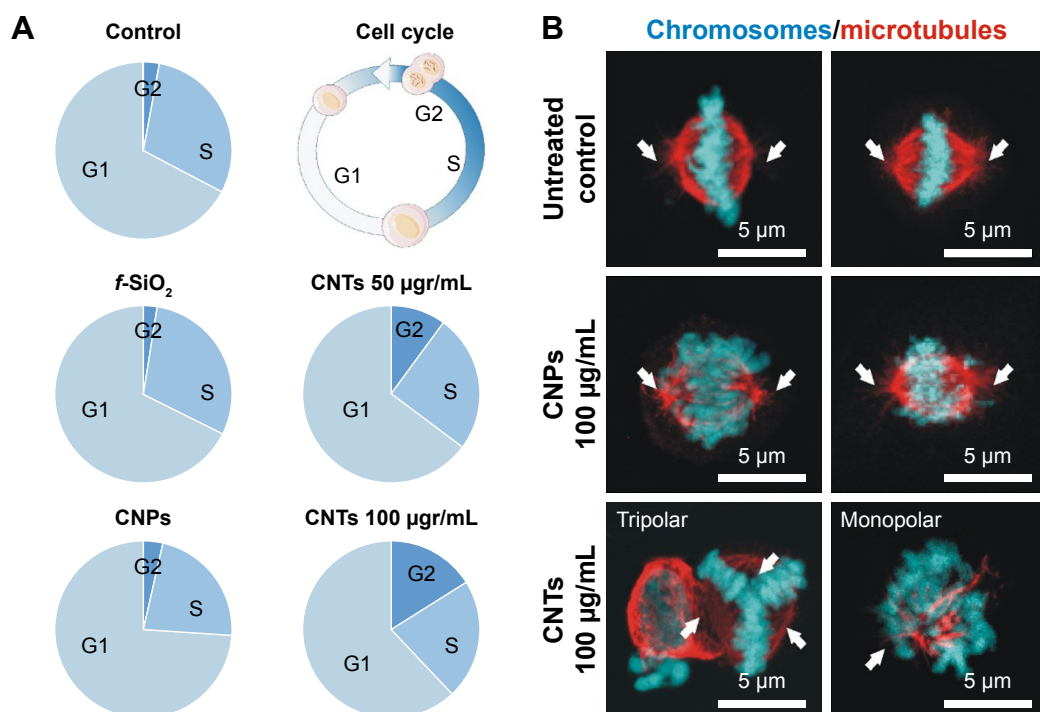


Figure 5 (A) CNPs do not interfere with cell proliferation.

Notes: Quantification of cells at the different stages of the cell proliferation cycle (G1, S, G2) using flow cytometry. CNPs display a similar cell distribution to controls (untreated and f-SiO₂-treated cells). Conversely, CNT-treated cells show an obvious dose-dependent cell proliferation blockage in G2. **(B)** Confocal microscopy projection images of mitotic spindles in untreated controls and cells treated with 100 µg/mL attached to CNPs or dispersed (bottom). Aberrations in the organization of the spindle microtubules (red channel) are observed only in CNT-treated cells. White arrows show the centrosomal location.

Abbreviations: CNPs, CNT-bearing particles; CNT, carbon nanotube; f-SiO₂, fluorescent-labeled silica particles.

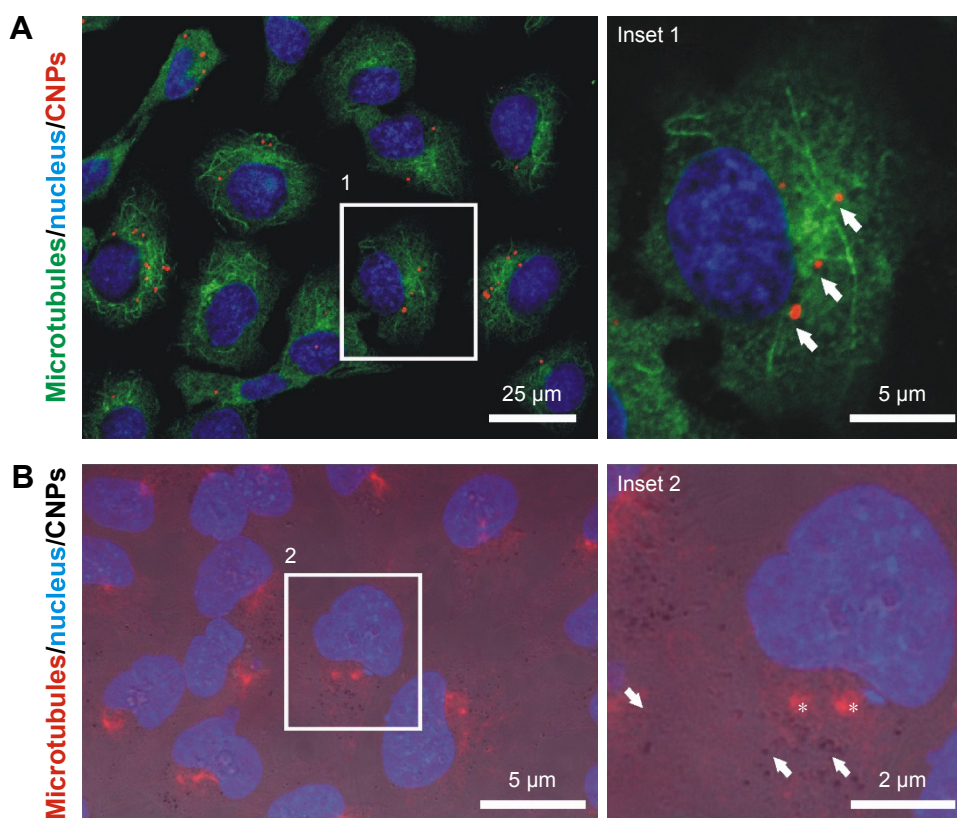


Figure 6 (Continued)

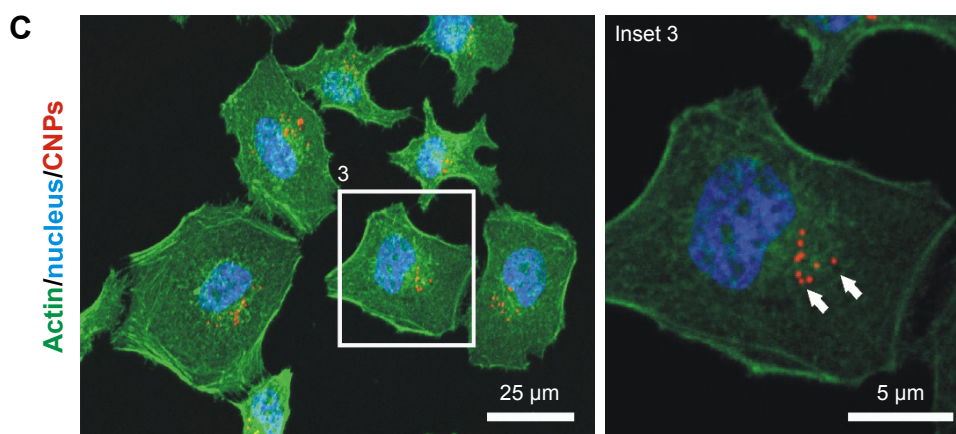


Figure 6 Depolymerization/repolymerization experiment performed in live HeLa cells containing CNPs.

Notes: (A) Confocal microscopy image of HeLa cells containing CNPs (red channel, arrows). Repolymerizing microtubules (green channel) do not nucleate at the particles. (B) Fluorescence + phase contrast microscopy on HeLa cells treated with unlabeled CNPs (arrows). The CNT coating of the particle allows particle identification in the phase contrast image. No tubulin nucleation (red channel) is observed in the surroundings of the CNPs. Asterisks indicate the location of the centrosomes. (C) Actin nucleation (green channel) is not observed in the surroundings of the CNPs (arrows).

Abbreviations: CNPs, CNT-bearing particles; CNT, carbon nanotube.

on the CNPs was not detected either. In conclusion, these polymerization patterns suggest that neither tubulin nor actin interacted with CNTs gathered on CNPs, and validate the hypothesis of the biomimetic interaction of 1D CNTs with the intracellular cytoskeletal filaments.

Conclusion

These experiments demonstrate how the presence of intracellular CNTs is not sufficient to trigger cytotoxicity, and how this is determined by the dispersion of the CNTs. Our experiments support the idea that individualized CNTs can freely interact with the cellular filaments, triggering lethal biomimetic cytotoxic or genotoxic effects, while identical CNTs assembled onto templates cannot interfere with the function of intracellular nanofilaments, and thus, result innocuous to the same cells at comparable dosages. The simplest explanation is that dispersed nanotubes behave as nanomaterials, while CNPs behave like submicrometric materials. This fact has critical implications in biology because nanomaterials, and in particular CNTs, display highly reactive surfaces, as well as morphological resemblance to the cytoskeletal elements that favor their biomimetic interaction triggering a biomechanical impedance that leads to cell death. When CNTs are attached to templates, these nanofilaments do not interact with the cellular cytoskeleton behaving more like particulate materials, and thus becoming more biocompatible. These urge the revision of many of the nanotoxicological tests, often designed for standard chemicals now applied to nanomaterials. Here we demonstrate how the classical Paracelsus dogma “the dose makes the poison” is not applicable for CNTs.

Understanding the actual significance of the toxicity of CNTs provides new cues in the development of radically new delivery systems opening many new expectations and uses of CNTs in nanomedicine.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs Sumaira Ashraf and Iñigo Casafont for their technical assistance with microscopy analysis, and the Nikon A1R Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute for the microscopy. This work was supported by the Spanish MINECO Project (references 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 and Fundación Tatiana Pérez de Guzmán El Bueno.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Mehra NK, Mishra V, Jain NK. A Review of ligand tethered surface engineered carbon nanotubes. *Biomaterials*. 2014;35(4):1267–1283.
2. De Volder MF, Tawfik SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*. 2013;339(6119):535–539.
3. Hernández-Rivera M, Zaibaq NG, Wilson LJ. Toward carbon nanotube-based imaging agents for the clinic. *Biomaterials*. 2016;101:229–240.
4. Sajid MI, Jamshaid U, Jamshaid T, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *Int J Pharm*. 2016;501(1–2):278–299.
5. Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, et al. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Lett*. 2004;4(11):2233–2236.

6. Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S, Poma A. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res*. 2011;722(1):20–31.
7. Ghosh M, Chakraborty A, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells. *J Hazard Mater*. 2011;197:327–336.
8. Guo Y-Y, Zhang J, Zheng Y-F, Yang J, Zhu X-Q. Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Mutat Res*. 2011;721(2):184–191.
9. Cveticanin J, Joksic G, Leskovic A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology*. 2010;21(1):15102.
10. Siegrist KJ, Reynolds SH, Kashon ML, et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fiber Toxicol*. 2014;11:6.
11. Muller J, Decordier I, Hoet PH, et al. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):427–433.
12. Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat Res*. 2012;745(1–2):28–37.
13. Gonzalez L, Decordier I, Kirsch-Volders M. Induction of chromosome malsegregation by nanomaterials. *Biochem Soc Trans*. 2010;38(6):1691–1697.
14. Rodríguez-Fernández L, Valiente R, González J, Villegas JC, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano*. 2012;6(8):6614–6625.
15. Srivastava RK, Pant AB, Kashyap MP, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicology*. 2011;5(2):195–207.
16. Reddy AR, Reddy YN, Krishna DR, Himabindu V. Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicology*. 2010;272(1–3):11–16.
17. Migliore L, Saracino D, Bonelli A, et al. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 Cells. *Environ Mol Mutagen*. 2010;51(4):294–303.
18. Dong C, Eldawud R, Sargent LM, et al. Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung epithelial cells in a time-dependent manner. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2015;3:3983–3992.
19. Lacerda L, Russier J, Pastorin G, et al. Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*. 2012;33(11):3334–3343.
20. Maruyama K, Haniu H, Saito N, et al. Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:793186.
21. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. 2008;3(7):423–428.
22. Ali-Boucetta H, Nunes A, Sainz R, et al. Asbestos-like pathogenicity of long carbon nanotubes alleviated by chemical functionalization. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(8):2274–2278.
23. Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(49):E1330–E1338.
24. Holt BD, Shams H, Horst TA, et al. Altered cell mechanics from the inside: dispersed single wall carbon nanotubes integrate with and restructure actin. *J Funct Biomater*. 2012;3(2):398–417.
25. Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(1):242–250.
26. García-Hevia L, Valiente R, Fernández-Luna JL, et al. Inhibition of cancer cell migration by multiwalled carbon nanotubes. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(11):1640–1644.
27. Ma X, Zhang LH, Wang LR, et al. Single-walled carbon nanotubes alter cytochrome c electron transfer and modulate mitochondrial function. *ACS Nano*. 2012;6(12):10486–10496.
28. Wang LR, Xue X, Hu XM, et al. Structure-dependent mitochondrial dysfunction and hypoxia induced with single-walled carbon nanotubes. *Small*. 2014;10(14):2859–2869.
29. Garibaldi S, Brunelli C, Bavastrello V, Ghigliotti G, Nicolini C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology*. 2006;17(2):391–397.
30. Mooney E, Dockery P, Greiser U, Murphy M, Barron V. Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation. *Nano Lett*. 2008;8(8):2137–2143.
31. Vittorio O, Raffa V, Cuschieri A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomedicine*. 2009;5(4):424–431.
32. Ju L, Zhang G, Zhang X, et al. Proteomic analysis of cellular response induced by multi-walled carbon nanotubes exposure in A549 cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e84974.
33. Yehia HN, Draper RK, Mikoryak C, et al. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J Nanobiotechnology*. 2007;5:8.
34. Lobo AO, Antunes EF, Machado AHA, Pacheco-Soares C, Trava-Airoldi VJ, Corat EJ. Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films. *Mater Sci Eng C*. 2008;28(2):264–269.
35. Pacurari M, Qian Y, Fu W, et al. Cell permeability, migration, and reactive oxygen species induced by multi-walled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2012;75(2):112–128.
36. Marchesan S, Kostarelos K, Bianco A, Prato M. The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. *Mater Today*. 2015;18(1):12–19.
37. Weissker U, Hampel S, Leonhardt A, Büchner B. Carbon nanotubes filled with ferromagnetic materials. *Materials*. 2010;3(8):4387–4427.
38. Authors not listed. The dose makes the poison. *Nat Nanotechnol*. 2011;6:329.
39. Pampaloni F, Florin EL. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol*. 2008;26(6):302–310.
40. Dinu CZ, Bale SS, Zhu G, Dordick JS. Tubulin encapsulation of carbon nanotubes into functional hybrid assemblies. *Small*. 2009;5(3):310–315.
41. Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(1):123–130.
42. Zhang Y, Wang B, Meng X, Sun G, Gao C. Influences of acid-treated multiwalled carbon nanotubes on fibroblasts: proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Ann Biomed Eng*. 2011;39(1):414–426.
43. Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(3):424–432.
44. García-Hevia L, Villegas JC, Fernández F, et al. Multiwalled carbon nanotubes inhibit tumor progression in a mouse model. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(9):1080–1087.
45. Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(3):765–768.
46. Correa-Duarte MA, Kosiorek A, Kandulski W, Giersig M, Liz-Marzán LM. Layer-by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes on spherical colloids. *Chem Mater*. 2005;17(12):3268–3272.
47. Correa-Duarte MA, Kosiorek A, Kandulski W, Giersig M, Salgueirinho-Maceira V. Nanoengineered polymeric thin films by sintering CNT-coated polystyrene spheres. *Small*. 2006;2(2):220–224.
48. Sanles-Sobrido M, Salgueirinho-Maceira V, Correa-Duarte MA, Liz-Marzán LM. Magnificent sea-anemone-like magnetic silica capsules reinforced with carbon nanotubes. *Small*. 2008;4(5):583–586.

49. Haniu H, Saito N, Matsuda Y, et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(6): 1679–1685.
50. Yaron PN, Holt BD, Short PA, Lösche M, Islam MF, Dahl KN. Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration. *J Nanobiotechnology*. 2011;9:45.
51. Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF, Dahl KN. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. *ACS Nano*. 2010;4(8):4872–4878.
52. García-Hevia L, Valiente R, González J, Fernández-Luna JL, Villegas JC, Fanarraga ML. Anti-cancer cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes. *Curr Pharm Des*. 2015;21(15):1920–1929.

Supplementary material

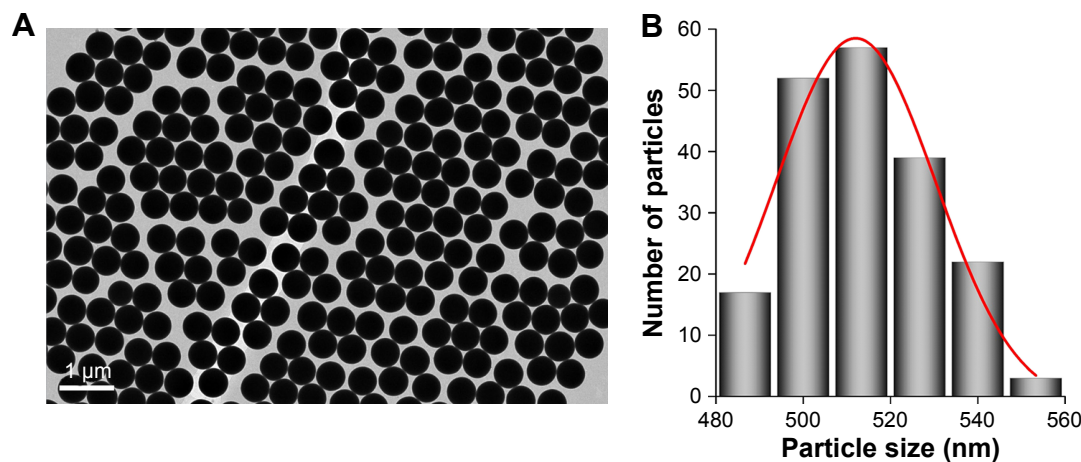


Figure S1 (A) Transmission electron microscopy image of the synthesized silica nanoparticles, and (B) histogram of particle size distribution (mean size: 512 ± 18 nm).

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Dovepress

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

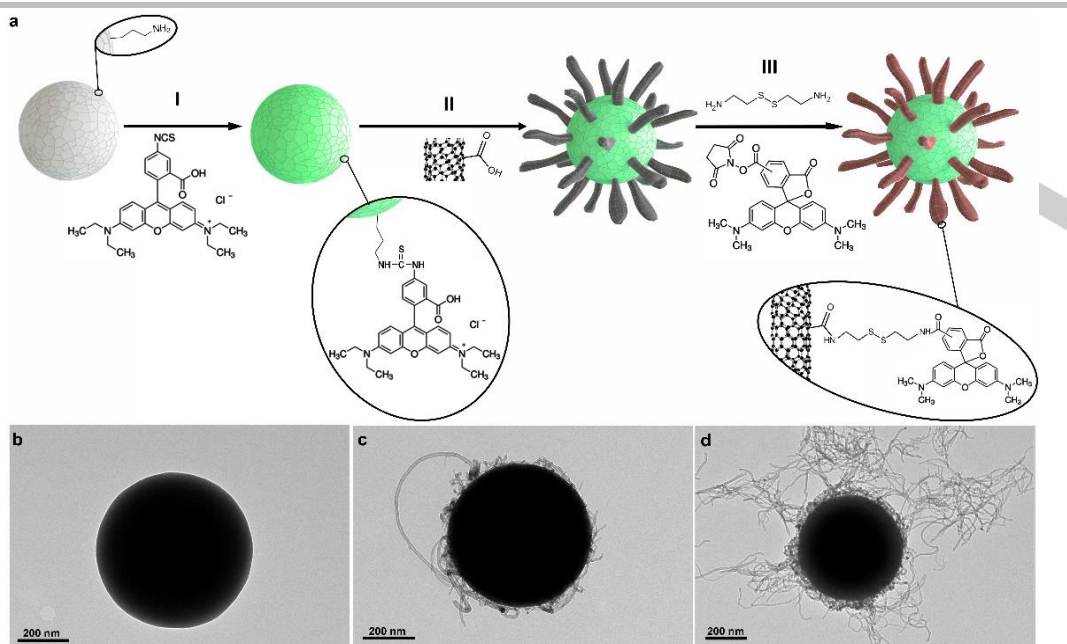


Figure 1. a) Sequential synthetic steps of the VMPs: (I) fluorescent labelling of the SiO_2 uncoated particles ($f\text{-SiO}_2$), (II) deposition of CNTs on VMPs, and (III) 5-TAMRA-VMP fluorescent labelling. TEM images of (b) $f\text{-SiO}_2$ and $f\text{-SiO}_2$ coated with (c) a single, or (d) double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

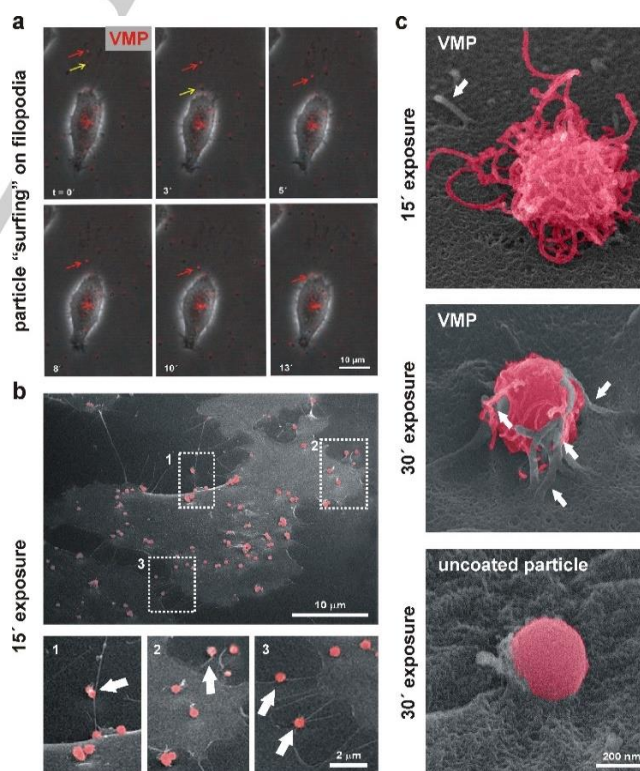


Figure 2. a) VMPs surfacing on filopodia (Video S1). Arrows point at VMPs (red fluorescence). b) SEM images of VMPs on human. c) Cell surface contacts with VMPs and $f\text{-SiO}_2$. Arrows point at cell filopodia embracing VMPs. Uncoated particles are captured by lamellipodia. Particles are pseudocoloured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

COMMUNICATION

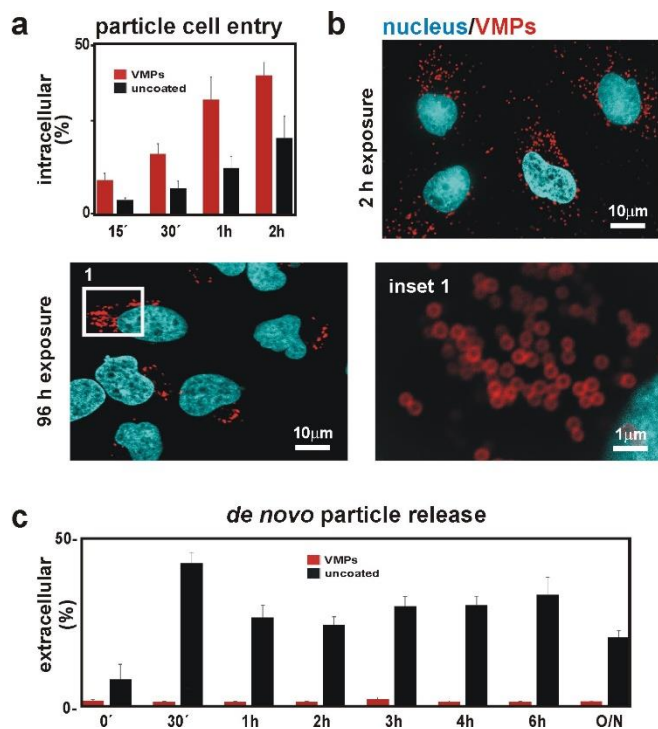


Figure 3. a) Quantification of particle uptake by HeLa cells. All values are significant for a $t > 5$; $p < 10^{-5}$; degrees of freedom $DF = 30$). b) VMPs appear throughout the cell cytoplasm soon after cell contact becoming perinuclear hours after engulfment (red channel). c) Quantification of *de 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.

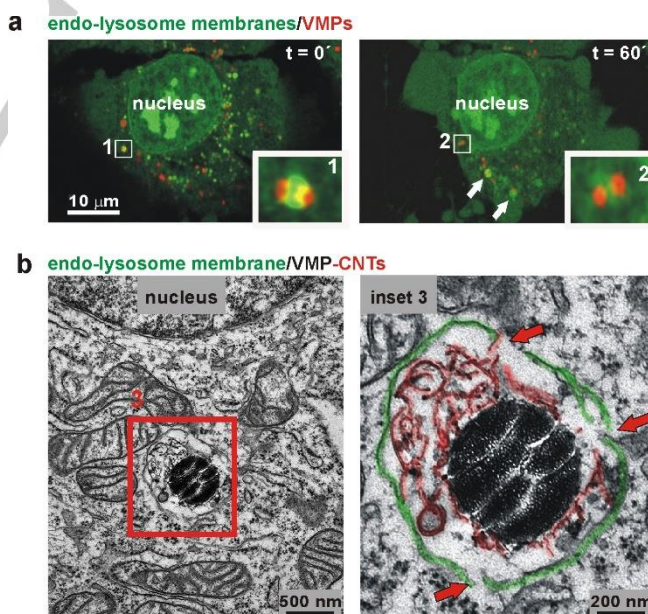
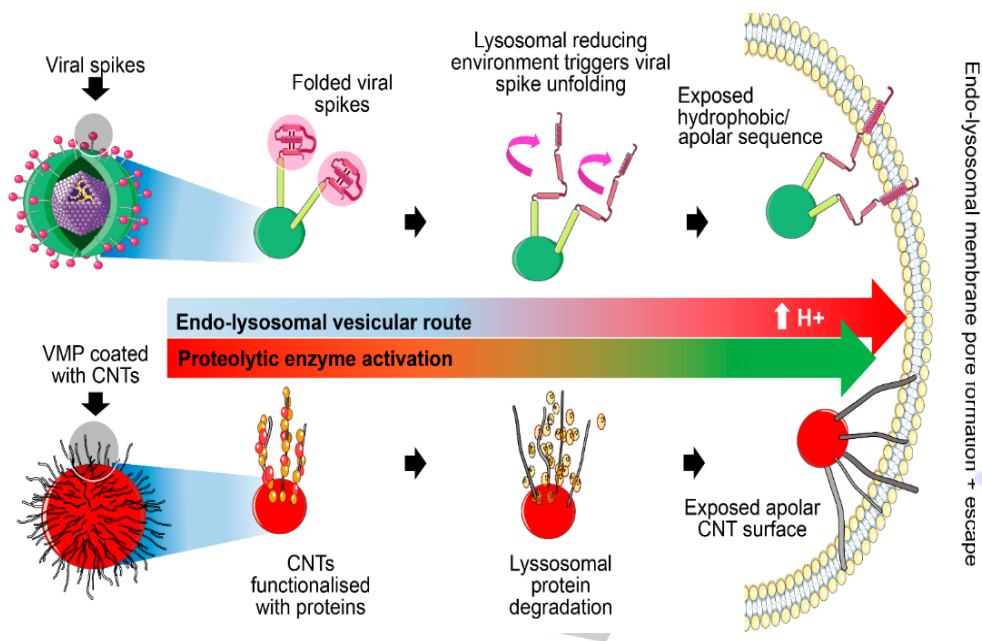


Figure 4. a) Photographs of video S2 demonstrating VMP escape from the E-L membranes. Insets show two VMPs (red channel) inside an E-L and the release of the endosomal contents prior particle escape. b) TEM images of a section of a HeLa cell displaying healthy mitochondria surrounding a permeabilized 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.

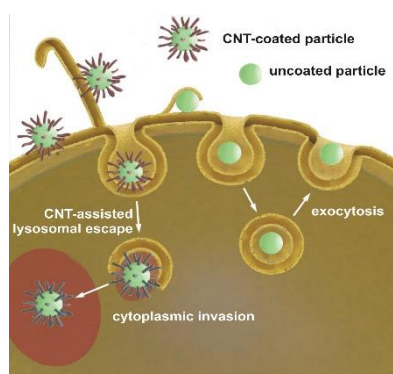
- [1] J. M. Kinchen, K. S. Ravichandran, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 781–95.
- [2] J. B. Lloyd, *Biochem. J.* **1986**, 237, 271–2.
- [3] H. K. Shete, R. H. Prabhu, V. B. Patravale, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, 14, 460–74.
- [4] J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.* **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., *Biomater. 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. Iturriz-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

Biodegradable multi-walled carbon nanotubes trigger anti-tumoral effects

View Article Online
DOI: 10.1039/C8NR03036G

E. González-Lavado,^a N. Iturrioz-Rodríguez,^a E. Padín-González,^a J. González,^a L. García-Hevia,^b J. Heuts,^a C. Pesquera,^a F. González,^a J. C. Villegas,^a R. Valiente,^a M. L. Fanarraga^a

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Carbon nanotubes have a huge biotechnological interest because they can penetrate most biological barriers and, inside cells, can biomimetically interact with the cytoskeletal filaments, triggering anti-proliferative and cytotoxic effects in highly dividing cells. Unfortunately, their intrinsic properties and bio-persistence represent a putative hazard that relapses their application as therapies against cancer. Here we investigate mild oxidation treatments to improve MWCNTs intracellular enzymatic digestion, but preserving their morphology, responsible for their intrinsic anti-cancer properties. Cell imaging techniques and confocal Raman spectroscopic signature analysis revealed that cultured macrophages can degrade bundles of oxidized MWCNTs (o-MWCNTs) in a few days. Isolation of nanotubes from these phagocytes 96 hours after exposure confirmed a significant reduction of approximately 30% in the total length of these filaments compared to control o-MWCNTs extracted from the cell culture medium, or the intracellular pristine MWCNTs. More interestingly, *in vivo* single intratumoral injections of o-MWCNTs 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 o-MWCNTs as antitumoral agents and reveal interesting clues of how to enhance *in vivo* carbon nanotube efficient clearance.

Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) are likely to participate in many new ground-breaking advances in nanomedicine including drug/gene delivery, tissue regeneration, bio-sensing, probes for diagnostics or monitoring, among many others.¹ CNTs 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 and proteins.^{2–4} These intrinsic properties of CNTs have a great potential if they are exploited in biotechnology.^{5–9}

Among CNTs, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) display unique biomimetic properties with microtubules^{10,11} that are well-established targets for many anticancer drugs such as taxol®.¹² Microtubules are highly dynamic intracellular tubulin protein nanotubes that play a central role in cell division and migration. These protein filaments and MWCNTs (i) self-assemble, (ii) have analogous dimensions, (iii) are exceptionally resilient and finally, (iv) show comparable extraordinary structural and surface properties (i.e. shear stress, bending stiffness, Young's modulus).^{10,13,14}

Similarities between MWCNTs and microtubules prompt their interaction *in vitro*¹⁵ and *in vivo*^{11,16} and the assembly of mixed bio-synthetic intracellular polymers that display an enhanced stability compared to conventional tubulin polymers.¹¹ This interaction triggers critical changes in the cellular biomechanics

resulting in anti-proliferative,¹¹ anti-migratory^{17,18} and cytotoxic¹⁹ effects in cancer cells *in vitro*, as well as significant anti-tumoral effects *in vivo*.²⁰ These results suggest CNTs could have a potential application as adjuvant or neoadjuvant therapies in the development of future anti-cancer agents.²¹ Unfortunately, despite these interesting results, there is a long way before MWCNTs can be applied to humans. Their potential long-term effects due to tissue damage and accumulation are key issues to control and improve. Among the unwanted side effects in healthy cells and tissues, MWCNTs trigger: inflammatory reactions, cytotoxicity, DNA breakage, chromosomal mal-segregation, etc.^{22–26} Thus, the “Achilles heels” for the potential applications of MWCNTs as nanomedicines is the complete inactivation and/or clearance of these nanomaterials after therapy.

The discovery of CNT bio-degradation *in vitro* by phagocytic cells has opened new opportunities. These cells have an extraordinary degradative potential, and can break down virtually all kinds of biomolecules captured by the endocytic or phagocytic entry routes. Their lysosomes, apart from displaying a pH of 4.5, contain a large variety of enzymes (acid-hydrolases and peroxidases) that are able to gradually digest CNTs.^{27–33} Macrophages,³² microglia,^{33–36} neutrophils^{37,38} and eosinophils³¹ have all been confirmed to degrade CNTs in culture after different previous surface treatments. Paradoxically, phagocytes are more susceptible than other cells to CNT-toxicity, at least *in vitro*.^{19,39} Their avidity to capture these foreign materials often results in the production of intolerable levels of superoxides and hydroxyl radicals involved in the oxidative stress reaction triggered during CNT degradation.^{25,32,35,40–42}

Some studies support the idea that reaching an equilibrium between phagocyte nanotube intake and clearance is critical to prevent tissue bioaccumulation and damage. But improving MWCNT biodegradation is not a trivial task. These fibres are

^a Grupo de Nanomedicina Universidad de Cantabria-IDIVAL, Herrera Oria s/n, 39011, Santander, Spain.

^b INL, Avda. Maestre José Veiga, 4715-403 Braga, Portugal.

^c Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

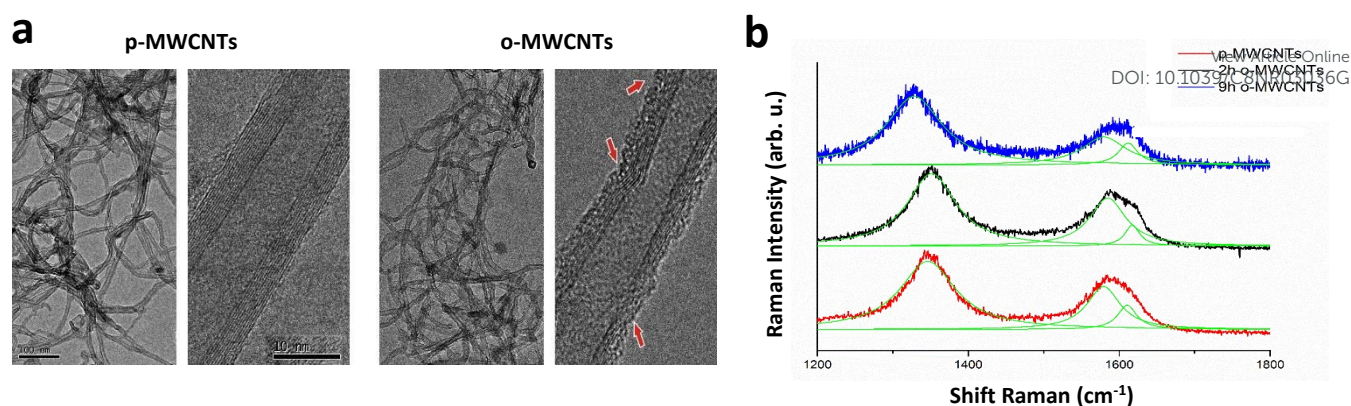


Fig. 1. Characterization of the o-MWCNTs. (a) Low and high-resolution transmission electron microscopy (TEM) pictures of p-MWCNTs and 9 h o-MWCNTs demonstrating a general preservation of the morphology but small defects on the outer o-MWCNT walls (arrows). (b) Raman spectra of p-MWCNTs and o-MWCNTs (2 h and 9 h) samples. The Lorentzian curves (green) fitting used for peak area determination are also shown.

some of the strongest and stiffest materials and thus, they are highly stable under standard *in vivo* physiological conditions. Their bio-persistence depends on (i) the number of walls of the nanotube, (ii) the surface and diameter of the tubes, (iii) the dose, (iv) route of administration and finally, (v) their surface functionalisation.^{24,26,43–46} Interestingly, several studies show how CNT degradation by biological enzymes is significantly enhanced when the nanotube surface is chemically modified by oxidation.^{34,35,45,47–51} This treatment results in the formation of different functional groups on the CNT surface, and structural defects in the nanotube walls that serve as macrophage enzymatic “attack” sites for wall degradation. Based on these findings, we have explored various surface oxidation pre-treatments to enhance MWCNT clearance by macrophages preserving their biomimetic properties with microtubules, in ultimate term responsible for their anti-proliferative, anti-migratory and cytotoxic effects in cancer cells.

Results and discussion

MWCNT oxidation pre-treatment.

To improve intracellular CNT degradation, pristine MWCNTs (p-MWCNTs) were oxidized in a v/v = 3/1 mixture of H₂SO₄/HNO₃ at 37° C for two different periods of time (2 and 9 h, as indicated). As described elsewhere,⁵² this treatment generates the formation of functional groups such as –C–OH groups that can be transformed into –C=O groups on the outer surface of the oxidized MWCNTs (o-MWCNTs). To characterize this process and to obtain valuable information about the structure, composition and surface adsorbed molecules and defects on o-MWCNTs we employed transmission electron microscopy (TEM) and Raman spectroscopy to characterize the degree of structural defects/changes and to monitor the different vibrational active modes produced by the oxidation processes (see also Fig. S1).^{53,54}

TEM imaging of the p-MWCNTs and the 9h o-MWCNTs (Fig. 1a) revealed defects including: (i) a reduction of the number of

walls, from 12–16 walls in pristine sample to 8–10 average carbon layers in o-MWCNTs, (ii) changes in the outer and inner walls, (iii) layer exfoliation, (iv) small surface imperfections and finally, (v) wall bending or breaks. This technique also served to demonstrate a general good preservation of the o-MWCNTs (i.e. diameter and length, see below).

Raman spectroscopy, yields key information of the purity and defects of the MWCNTs, allowing the identification of this type of nanotubes among other carbon compounds. In particular, the measurement of the integrated intensity ratio between the D and G bands (A_D/A_G) is a way to semi-quantify the degree of structural defects in the nanotube sample (Table 1).^{33,34,36,45,55,56}

Fig. 1b displays representative Raman spectra of p-MWCNT, 2 and 9 h pre-oxidized MWCNT samples showing the characteristic D and G bands at ca. 1350 cm⁻¹ and 1590 cm⁻¹, respectively. These bands represent a good fingerprint of the graphitization of the sample, where the D band is assigned to the presence of disorder, and the G band corresponds to the tangential vibrations of carbon atoms along the layer. The D' band, at ca. 1615 cm⁻¹ can also be observed as a shoulder attached to the G band. Interestingly, the G band shifts towards lower wavenumbers with longer oxidation treatments indicating the charge transfer produced by the processes of oxidation and degradation modifying the charge at the MWCNT surface.^{57,58} Based on these studies, we compared the A_D/A_G integrated intensity ratios of p-MWCNTs, 2 h and 9 h o-MWCNTs to estimate the degree of surface defects triggered by the oxidation pre-treatment on the surface of the nanotubes samples. Results summarized in Table 1 confirmed a relationship between the oxidation time and the structural defects on the surface of the nanotubes, validating the effectiveness of the applied treatment.

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

Table 1. Analysis of the A_D/A_G ratios for pristine (p-MWCNTs), 2 h and 9 h oxidized (o-MWCNTs) nanotubes

Improved o-MWCNTs degradation by cultured macrophages.

MWCNTs used as anti-tumoral agents should normally be degraded at the tumour site by the tumour-associated-macrophages and/or local stromal cells. Thus, to evaluate the improved biodegradation of MWCNTs bundles inside these cells, we used phase contrast microscopy on immortalized macrophages exposed to 5 µg/mL of 2 h and 9 h o-MWCNTs in the culture medium. As Fig. S2 shows, macrophages exposed during 72 h to 9 h o-MWCNTs displayed a significant reduction of the intracellular black-carbon masses compared to identical cells exposed to 2 h o-MWCNTs. As observed by other authors,⁵⁹ MWCNT oxidation was also accompanied by an improved phagocyte survival rate (Fig. S2c).

The intracellular degradation process was verified using other techniques. To further confirm intracellular o-MWCNT degradation, we extracted nanotubes from the cells exposed to 9 h o-MWCNTs or p-MWCNTs during 96 h (see the Experimental section). Extracted nanotubes were compared to the *as prepared* original nanotubes characterised in Fig. 1, and the nanotubes present in the culture medium where macrophages were growing (see the experimental diagram in Fig. S3). Nanotubes extracted from cells, the culture media and the *as prepared* material were photographed using TEM (Fig. 2) and were measured to evaluate degradation. Quantitative and qualitative analysis of these nanotube samples demonstrated a significant reduction in the total lengths of the intracellular o-MWCNTs indicative of intracellular degradation.

As an additional technique, we use confocal Raman spectroscopy, focusing the laser beam spot within the carbon-containing phagosomes in the cytoplasm of macrophages (white cross in Fig. S2) to investigate degradation. As in the previous study, we semi-quantified degradation calculating the A_D/A_G ratios at different times (12, 24, 48, 72 and 96 h) recording the signatures of the D and G bands in the wavelength range 1200-1800 cm^{-1} (Figs. 2, S4) in a total of 10-20 randomly taken intracellular spots of 1 μm^2 area. Results shown in Fig. 2b suggest that 9h o-MWCNTs begin biodegradation in macrophages soon after phagocytosis.

o-MWCNT display biomimetic anticancer cytotoxic effects *in vitro*.

We now tested the anti-cancer cytotoxic effects of o-MWCNTs on HeLa cells following previously published protocols.¹¹ Confocal microscopy examination of 50 µg/mL o-MWCNT treated cell cultures served to confirm signs indicative of the biomechanical disruptive effect of these nanotubes on HeLa, including: (i) cell retraction, (ii) membrane blebbing, (iii) nuclear DNA compaction, (iv) presence of micronuclei (Figs. 3a -white asterisks, S5), as well as other previously described cytoskeletal changes including a disorganized microtubular patterns or a reactive cortical actin.¹⁸ Interestingly, many cells presented long extra-cellular actin/tubulin-coated extensions, measuring 10-15 µm, similar to those shown to contain MWCNTs in previous studies (red-green arrows).¹¹ Similar experiments were also performed in parallel on malignant cancer cells. For this purpose we selected the B16-F10 murine cell line, a multi-resistant malignant melanoma that displays an aggressive

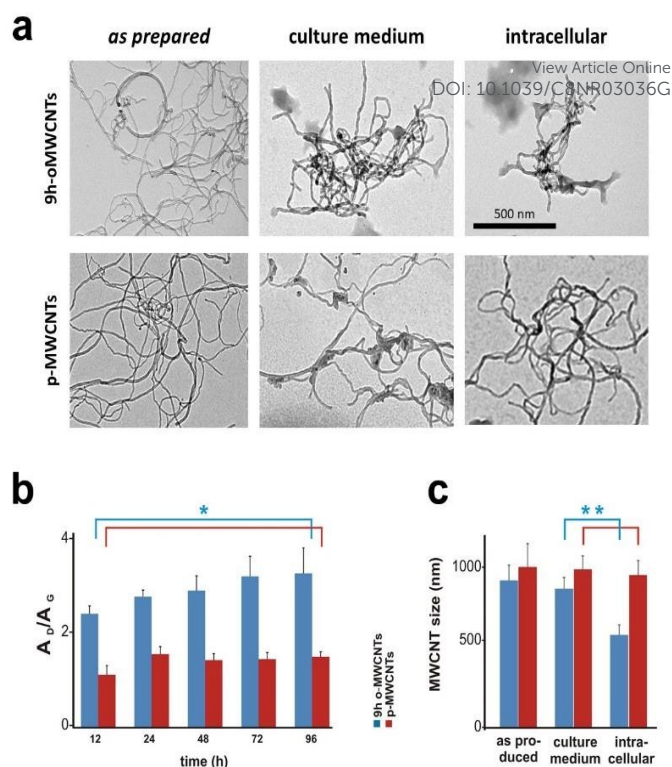


Fig. 2. o-MWCNTs are processed inside macrophages. (a) TEM images of the *as prepared* o-MWCNTs or p-MWCNTs, and identical nanotubes extracted from the culture medium or from macrophages 96 h after incubation (see Fig. S3). All images display identical magnification. (b) Semi-quantification of the structural defects on intracellular nanotubes using Raman spectroscopy (results from spectrograms in Fig. S4) (oMWCNTs $t = 1.86$; $n = 28$; pMWCNTs $t = 1.84$; $n = 22$; $* = t_{.95}$). (c) Quantification of the average lengths of the different nanotube samples. o-MWCNTs isolated from inside macrophages displayed significantly smaller sizes ($t = 2.98$ $n = 59$; $** = t_{.995}$) that those obtained from the culture medium of the phagocytes. On the contrary, p-MWCNTs did not shortened inside macrophages after 96 h ($t = 0.26$ $n = 58$).

nature, is genetically heterogeneous and is highly metastatic (Fig S6).⁶⁰

o-MWCNTs inhibit tumour progression *in vivo* in a mouse model and degrade in the tumoral tissues.

The anti-tumoral effects of o-MWCNTs were tested on solid melanoma tumours produced by transplantation of B16-F10 cells. This system model is highly representative of most malignant tumours, being characterized by local acidosis, oedema and abundant tumour-associated supporting stromal cells that include macrophages.^{60,61} To improve reproducibility, solid pigmented melanoma tumours were injected only once with 2 µg of serum-functionalised nanotubes resuspended in a saline solution containing antibiotics (see the Experimental section). Intra-tumoral injection experiments were performed systematically in total population of more than 150 transplanted mice (see below) that were sacrificed 4 days post-injection. As a control, we injected the resuspension medium in sibling mice obtained from the same litter. Results shown in Fig. 3b-c demonstrate a patent tumoral size reduction in o-MWCNT treated animals compared to controls. Melanoma mass quantification revealed a ca. 30 % weight reduction in o-

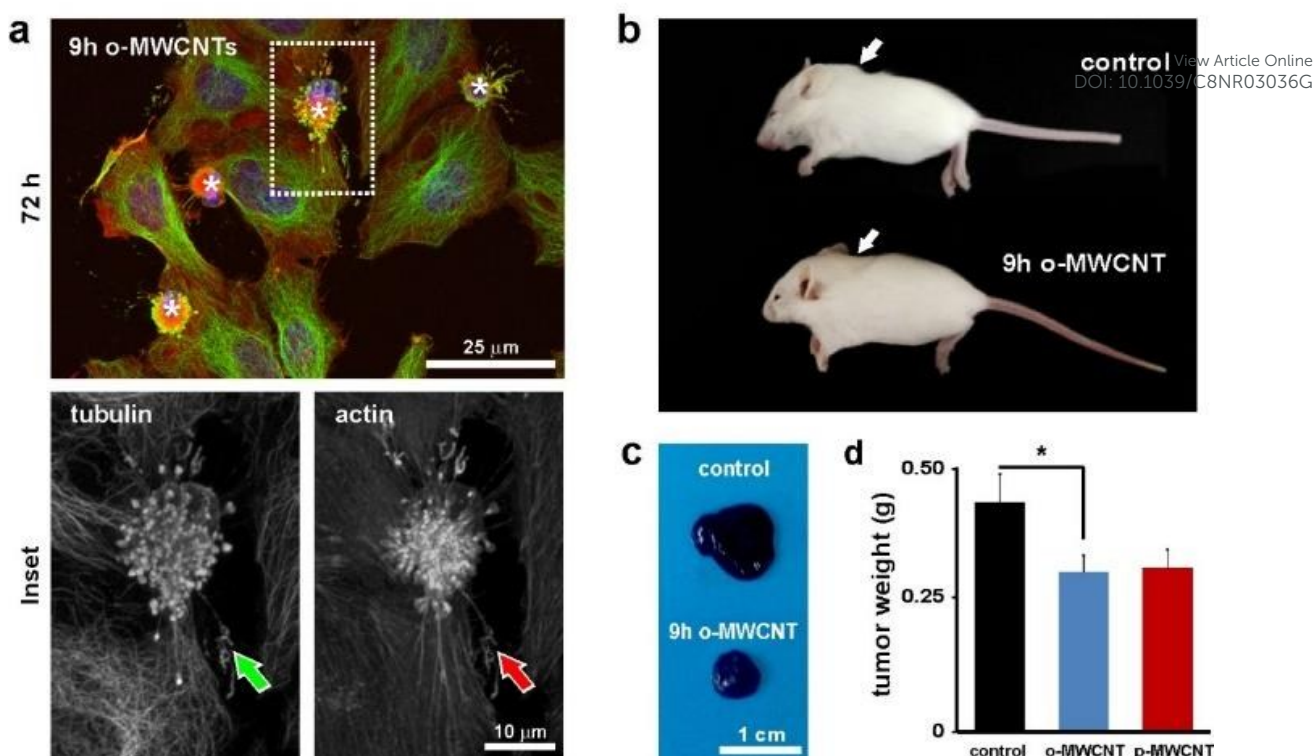


Fig. 3. *In vitro* and *in vivo* o-MWCNTs effects. (a) Confocal microscopy projection images of HeLa cells exposed to o-MWCNTs for 72 h. Representative image demonstrating the apoptotic effect o-MWCNTs. Dying cells (white asterisk) typically display signs indicative of apoptosis. Acentrosomal microtubule networks (green channel) and actin microfilament reorganization (red channel) are also patent in most cells. (inset) Apoptotic cells show abnormally long cytoplasmic extensions labelled for tubulin (green arrow) and actin (red arrow). (b) Antineoplastic effect of o-MWCNTs in solid melanoma tumours. Representative mouse littermates bearing solid melanoma tumours 96 h after a single intra-tumoral injection of resuspension medium (control) or o-MWCNTs post treatment. Arrows point at the tumour location. (c) Representative solid pigmented melanoma tumoral masses, 96 h after a single injection containing 2 μ g o-MWCNT treatment. (d) Statistical evaluation of the average tumoral size 96 h post-treatment (single injection containing 2 μ g o-MWCNT). Biodegradable o-MWCNTs trigger a statistically significant anti-tumoral effect ($t = 1.5$ $n = 146$; $* = t_{.90}$) but indistinguishable to that observed for p-MWCNTs.

MWCNT-treated tumours significant ($t = 1.5$; $n = 146$, Fig. 3d). This anti-tumoral effect was undistinguishable to that observed in mice injected with p-MWCNTs ($t = 0.2$; $n = 161$). Finally, the biodegradability of the injected nanotubes at the tumoral organ was evaluated using Raman spectroscopy. Semi-quantification of the A_D/A_G bands in peritumoral and intratumoral tissue sections revealed a significant degradation of the injected o-MWCNTs *in situ*, 18 and 15 days after injection respectively, while no significant changes were observed for p-MWCNTs as these time points (Fig. 4).

Summarizing, here we present a bio-compatibilization method that can be used to improve the risk-to-benefit ratio of MWCNTs for their potential used as nanomedicines against cancer, either as adjuvant or as neoadjuvant therapies. Moreover, identical pre-treatments can be used for nanotubes used as surface coatings in the assembly of multi-structured nanodelivery carrier devices to improve intracellular cytoplasmic targeting.⁸

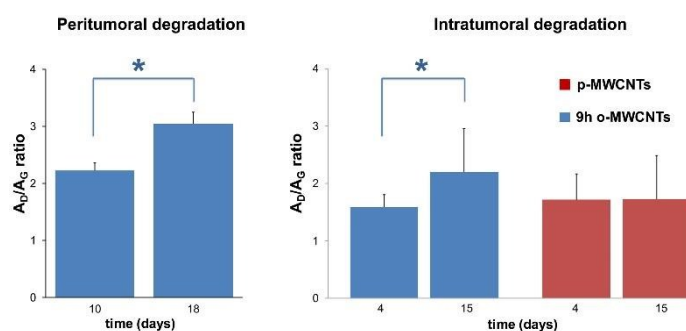


Fig. 4. Raman spectroscopic semi-quantitative analysis of o-MWCNT degradation in the tumoral organ. Time indicates days post injection. Pre-oxidized MWCNTs show a patent peritumoral ($t = 1.6$ $n = 29$; $* = t_{.90}$) and intratumoral ($t = 1.4$; $n = 6$; $* = t_{.90}$) biodegradation compared to p-MWCNTs ($t = 0.01$; $n = 5$).

Experimental

MWCNT oxidation and characterization.

High-purity MWCNT obtained from Nanocyl NC3100™ were dispersed by sonication for 5 minutes in a 3:1 mixture of H₂SO₄ (98%)/HNO₃ (65%) and were incubated at 37 °C under continuous shaking.^{26,45} Resulting as prepared MWCNTs were fully characterised by Raman and IR spectroscopy, TGA, mass spectrometry and TEM (Fig. S1). Samples were taken at 2 or 9 h. The acid solution was removed by filtration through a 0.45 µm and were washed in H₂O until pH ~7. o-MWCNTs were dispersed and functionalised with serum-containing culture medium as previously described.¹¹ Final working solutions were centrifuged 2 min. at 10,000 g to remove micrometric aggregates before concentration determination by optical absorption at 550 nm. Raman spectra were taken with a Horiba T64000 triple spectrometer in the backscattering geometry, a 647 nm line of a Coherent Innova Spectrum 70c Ar⁺–Kr⁺ laser and a nitrogen-cooled CCD (Jobin-Yvon Symphony). A confocal microscope was used for the intracellular sample Raman spectra detection focusing the laser beam into a 1 µm² with a 100x objective as described in previous studies.¹¹ MWCNT were identified using unique fingerprints characterizing a number of well-defined resonances⁵⁵ such as the dispersive disorder induced D band, the tangential G and the D' band, which are attributed using the symmetry analysis to the longitudinal optical mode (LO) close to Brillouin zone centre (Γ).⁶² The D-band representing the asymmetrical properties of the tubes (structural defects), and the G-band the planar carbon atom vibrations (linear structure). Raman features such as the radial breaching modes (RBM), associated with a small diameter inner tube (less than 2 nm), are usually too weak to be observable in these large diameter tubes.^{63,64} As for previous studies, the ratio between the areas of the intensity the D and G peaks (A_D/A_G) were used to characterize the structural disorganization that MWCNTs undergo during oxidation and intracellular degradation.^{32–34,45} The average intensities of more than 10 spectra for each time and MWCNT type and experimental time are represented in histograms of Fig. 2c. Transmission electron microscopy was performed in a JEOL JEM 2100 operated at 120 kV on ethanol-dispersed samples adsorbed onto a Lacey copper grid. Infrared spectra were recorded on a Jasco LE4200 spectrophotometer. TGA was carried out using a Setaram Setsys Evolution 1700 apparatus, ranging from ca 20 - 900 °C. Samples were placed into platinum crucibles. Measurements were performed in nitrogen atmosphere with a heating rate of 10 °C/min at a total flow rate of 20 mL/min. A mass spectrometer, Pfeiffer OmniStar Prisma, attached to the TG equipment allowed us to follow the exhausted CO₂ gas.

Cell culture and viability studies.

HeLa and murine macrophage cells (J774) were grown in cultured with Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Biowhittaker™) and Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) respectively, containing 10% FBS, and were kept in standard conditions. HeLa and J774 cells were exposed to 50

and 5 µg/mL respectively. Live/dead cell assessment was performed automatically using a trypan blue assay (Sigma-Aldrich) on a Bio-Rad TC-20 cell counter at the indicated times. An average of 540,000 macrophage cells were automatically counted for each condition.

MWCNT isolation from cells/medium.

Macrophage cells were exposed to nanotubes in the culture medium for 96 h before extraction. Identical amounts of cells (ca. 9 × 10⁶ cells of each) and culture medium (500 µL of medium originally containing 50 µg/mL of nanotubes) were used for nanotube isolation. After cell pelleting, the culture media containing the resuspended MWCNTs and the cell pellets were processed in parallel for direct comparison. Samples were treated successively with 1% Triton X100 phosphate buffered saline (PBS), 35% HCl and acetone.

Statistical analysis.

A two-tailed *t*-test was used in all other statistical analysis. Significance was established for a *p* = 0.05 (*) or a *p* = 0.01 (**).

Imaging studies.

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Actin was stained with Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate and the DNA with Hoechst dye (both from Sigma-Aldrich®). 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®). Confocal and phase contrast images were taken using a Nikon A1R confocal microscope. Image processing was performed with the NIS-Elements Advanced Research software. Fluorescent images are pseudo-coloured.

o-MWCNT tumour growth studies *in vivo*.

Tumorigenesis was induced by subcutaneous transplantation of a total of 2 × 10⁵ B16-F10 melanoma cells in 10 µL of culture medium containing antibiotics following previously described procedures.⁶⁴ Animal experimentation procedures were performed according to EU legislation. All animal procedures were performed in accordance with the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals of The University of Cantabria and approved by the Animal Ethics Committee of this University. Solid pigmented tumours were single treated 7 days post-transplant with a unique dose of 2 µg of o-MWCNTs resuspended in a volume of 10 µL of culture medium. To reduce natural artefacts, littermates were injected in parallel with o-MWCNTs or the resuspension medium used as excipient. Tumours masses were carefully dissected and weighed 4 days post injection. Statistical analysis was performed using a *t*-test. The confidence levels and total number of events included in the study (*n*) are indicated in the figures. Quantitative results are expressed as mean values with their corresponding standard deviation error bars.

Conclusions

In conclusion, here we demonstrate o-MWCNT biodegradation in cultured cells and *in vivo*, at the tumoral site in mice bearing malignant tumours produced by transplantation. Biodegradation is detectable a few days after these nanotubes have had a therapeutic effect. This new property can serve to synergistically improve the already existing traditional microtubule-stabilizing chemotherapies such as taxol®, but also to enhance the *in vivo* degradation of carbon nanotubes as key components in the design of novel nanocarrier devices for their use in therapeutic fields other than cancer.

Current affiliations

Dr. L. García-Hevia, International Iberian Nanotechnology Institute, Braga, Portugal; Mr. J. Heuts, Leiden University, The Hague, The Netherlands.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank Débora. Muñoz for her technical assistance and Hector Terán for his preliminary contribution to these studies. We are grateful to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute. This work has been supported by the Spanish MINECO and European Union FEDER under Projects ref. PI13/01074, PI16/000496, MAT2015-69508-P, the NanoBioApp Network Ref. MINECO-17-MAT2016-81955-REDT, IDIVAL Projects ref. INVAL15/16, INVAL 17/11, PREVAL 16/03, and the Raman4clinics BMBS COST Action BM1401.

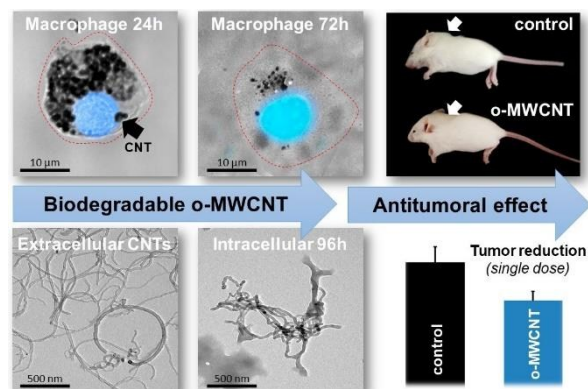
References

- 1 S. Marchesan, K. Kostarelos, A. Bianco and M. Prato, *Mater. Today*, 2015, **18**, 12–19.
- 2 L. Lacerda, J. Russier, G. Pastorin, M. A. Herrero, E. Venturelli, H. Dumortier, K. T. Al-Jamal, M. Prato, K. Kostarelos and A. Bianco, *Biomaterials*, 2012, **33**, 3334–3343.
- 3 X. Deng, G. Jia, H. Wang, H. Sun, X. Wang, S. Yang, T. Wang and Y. Liu, *Carbon N. Y.*, 2007, **45**, 1419–1424.
- 4 J. T. W. Wang, C. Fabbro, E. Venturelli, C. Menard-Moyon, O. Chaloin, T. Da Ros, L. Methven, A. Nunes, J. K. Sosabowski, S. J. Mather, M. K. Robinson, J. Amadou, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos and K. T. Al-Jamal, *Biomaterials*, 2014, **35**, 9517–28.
- 5 D. Pantarotto, J.-P. Briand, M. Prato and A. Bianco, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2004, 16–17.
- 6 P. C. B. De Faria, L. I. Dos Santos, J. P. Coelho, H. B. Ribeiro, M. A. Pimenta, L. O. Ladeira, D. A. Gomes, C. A. Furtado and R. T. Gazzinelli, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 5458–5470.
- 7 A. Masotti, M. R. Miller, A. Celluzzi, L. Rose, F. Micciulla, P. W. F. Hadoke, S. Bellucci and A. Caporali, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2016, **12**, 1511–1522.
- 8 N. Iturrioz-Rodríguez, E. González-Domínguez, E. González-Lavado, L. Marín-Caba, B. Vaz, M.-Pérez-Lorenzo, M. A. Correa-Duarte, M. L. Fanarraga, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2017, **56**, 13736–13740.
- 9 V. Castagnola, J. Cookman, J. M. de Araújo, E. Polo, Q. Cai, C. P. Silveira, Ž. Krpetić, Y. Yan, L. Boselli and K. A. Dawson, *Nanoscale Horiz.*, 2017, **2**, 187–198.
- 10 F. Pampaloni and E. L. Florin, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 302–310.
- 11 L. Rodríguez-Fernández, R. Valiente, J. González, J. C. Villegas and M. L. Fanarraga, *ACS Nano*, 2012, **6**, 6614–6625.
- 12 M. A. Jordan and L. Wilson, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, **10**, 123–130.
- 13 D. J. Odde, L. Ma, A. H. Briggs, A. DeMarco and M. W. Kirschner, *J. Cell Sci.*, 1999, **112**, 3283–3288.
- 14 P. J. de Pablo, I. A. T. Schaap, F. C. MacKintosh and C. F. Schmidt, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **91**, 98101.
- 15 C. Z. Dinu, S. S. Bale, G. Zhu and J. S. Dordick, *Small*, 2009, **5**, 310–315.
- 16 L. García-Hevia, F. Fernández, C. Grávalos, A. García, J. C. Villegas and M. L. Fanarraga, *Nanomedicine*, 2014, **9**, 1581–1588.
- 17 C. Dong, R. Eldawud, L. M. Sargent, M. L. Kashon, D. Lowry, Y. Rojanasakul and C. Zoica Dinu, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 3983–3992.
- 18 L. Garcia-Hevia, R. Valiente, J. L. Fernandez-Luna, E. Flahaut, L. Rodriguez-Fernandez, J. C. Villegas, J. Gonzalez and M. L. Fanarraga, *Adv. Healthc. Mater.*, 2015, **4**, 1640–1644.
- 19 L. García-Hevia, R. Valiente, J. González, J. Fernández-Luna, J. C. Villegas and M. L. Fanarraga, *Curr. Pharm. Des.*, 2015, **21**, 1920–1929.
- 20 L. García-Hevia, J. C. Villegas, F. Fernández, Í. Casafont, J. González, R. Valiente and M. L. Fanarraga, *Adv. Healthc. Mater.*, 2016, **5**, 1–21.
- 21 C. Fabbro, H. Ali-Boucetta, T. Da Ros, K. Kostarelos, A. Bianco and M. Prato, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3911.
- 22 S. Y. Madani, A. Mandel and A. M. Seifalian, *Nano Rev.*, 2014, **4**, 1–16.
- 23 S. Rittinghausen, A. Hackbarth, O. Creutzenberg, H. Ernst, U. Heinrich, A. Leonhardt and D. Schaudien, *Part. Fibre Toxicol.*, 2014, **11**, 59.
- 24 K. Kostarelos, *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**, 774–6.
- 25 J. K. Lee, B. C. Sayers, K.-S. Chun, H.-C. Lao, J. K. Shipley-Phillips, J. C. Bonner and R. Langenbach, *Part. Fibre Toxicol.*, 2012, **9**, 14.
- 26 R. F. Hamilton, Z. Wu, S. Mitra, P. K. Shaw and A. Holian, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 57.
- 27 V. E. Kagan, N. V. Konduru, W. Feng, B. L. Allen, J. Conroy, Y. Volkov, I. I. Vlasova, N. a. Belikova, N. Yanamala, A. Kapralov, Y. Y. Tyurina, J. Shi, E. R. Kisin, A. R. Murray, J. Franks, D. Stolz, P. Gou, J. Klein-Seetharaman, B. Fadeel, A. Star and A. a. Shvedova, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 354–359.
- 28 W. Seo, A. A. Kapralov, G. V. Shurin, M. R. Shurin, V. E. Kagan and A. Star, *Nanoscale*, 2015, **7**, 8689–8694.
- 29 A. A. Shvedova, A. A. Kapralov, W. H. Feng, E. R. Kisin, A. R.

- Murray, R. R. Mercer, C. M. St. Croix, M. a. Lang, S. C. Watkins, N. V. Konduru, B. L. Allen, J. Conroy, G. P. Kotchey, B. M. Mohamed, A. D. Meade, Y. Volkov, A. Star, B. Fadeel and V. E. Kagan, *PLoS One*, 2012, **7**, e30923.
- 30 C. Farrera, K. Bhattacharya, B. Lazzaretto, F. T. Andón, K. Hultenby, G. P. Kotchey, A. Star and B. Fadeel, *Nanoscale*, 2014, **6**, 6974–83.
- 31 F. T. Andón, A. A. Kapralov, N. Yanamala, W. Feng, A. Baygan, B. J. Chambers, K. Hultenby, F. Ye, M. S. Toprak, B. D. Brandner, A. Fornara, J. Klein-Seetharaman, G. P. Kotchey, A. Star, A. A. Shvedova, B. Fadeel and V. E. Kagan, *Small*, 2013, **9**, 2721–9, 2720.
- 32 D. Elgrabli, W. Dachraoui, C. Menard-Moyon, X. J. J. Liu, D. Begin, S. Begin-Colin, A. Bianco, F. Gazeau and D. Alloyeau, *ACS Nano*, 2015, **9**, 10113–10124.
- 33 M. Meneghetti, A. Bianco, A. Nunes, C. Bussy, L. Gherardini, M. Meneghetti, M. A. Herrero, A. Bianco, M. Prato, T. Pizzorusso, K. T. Al-Jamal, K. Kostarelos, A. A. Herrero, A. Bianco, M. Prato, T. Pizzorusso, K. T. Al-Jamal, K. Kostarelos, L. Gherardini, M. Meneghetti, M. A. Herrero, A. Bianco, M. Prato, T. Pizzorusso, K. T. Al-Jamal and K. Kostarelos, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 1485–1494.
- 34 C. Bussy, C. Hadad, M. Prato, A. Bianco and K. Kostarelos, *Nanoscale*, 2016, 590–601.
- 35 A. E. Goode, D. A. Gonzalez Carter, M. Motskin, I. S. Pienaar, S. Chen, S. Hu, P. Ruenaroengsak, M. P. Ryan, M. S. P. Shaffer, D. T. Dexter and A. E. Porter, *Biomaterials*, 2015, **70**, 57–70.
- 36 J. Russier, L. Oudjedi, M. Piponnier, C. Bussy, M. Prato, K. Kostarelos, B. Lounis, A. Bianco and L. Cognet, *Nanoscale*, 2017, **9**, 4642–4645.
- 37 I. I. Vlasova, T. V. Vakhrusheva, A. V. Sokolov, V. A. Kostevich, A. A. Gusev, S. A. Gusev, V. I. Melnikova and A. S. Lobach, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, **264**, 131–142.
- 38 N. Lu, J. Li, R. Tian and Y. Y. Peng, *Chem. Res. Toxicol.*, 2014, **27**, 1070–1077.
- 39 J. C. Villegas, L. Álvarez-Montes, L. Rodríguez-Fernández, J. González, R. Valiente and M. L. Fanarraga, *Adv. Healthc. Mater.*, 2014, **3**, 424–432.
- 40 O. Vittorio, V. Raffa and A. Cuschieri, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2009, **5**, 424–431.
- 41 J. Hou, B. Wan, Y. Yang, X.-M. Ren, L.-H. Guo and J.-F. Liu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 409.
- 42 V. E. Kagan, A. A. Kapralov, C. M. St Croix, S. C. Watkins, E. R. Kisin, G. P. Kotchey, K. Balasubramanian, I. I. Vlasova, J. Yu, X. Kang Kim, X. Wanji Seo, R. K. Mallampalli, A. Star and A. A. Shvedova, *ACS Nano*, 2014, **8**, 5610–5621.
- 43 N. Saito, H. Haniu, Y. Usui, K. Aoki, K. Hara, S. Takanashi, M. Shimizu, N. Narita, M. Okamoto, S. Kobayashi, H. Nomura, H. Kato, N. Nishimura, S. Taruta and M. Endo, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 6040–6079.
- 44 H. Nagai, Y. Okazaki, S. Chew, N. Misawa, Y. Yamashita, S. Akatsuka, T. Ishihara, K. Yamashita, Y. Yoshikawa, H. Yasui, L. Jiang, H. Ohara, T. Takahashi, G. Ichihara, K. Kostarelos, Y. Miyata, H. Shinohara and S. Toyokuni, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, **108**, 1330–1338.
- 45 A. R. Sureshbabu, R. Kurapati, J. Russier, C. Ménard-Moyon, I. Bartolini, M. Meneghetti, K. Kostarelos and A. Bianco, *Biomaterials*, 2015, **72**, 20–28.
- 46 A. Bianco, K. Kostarelos and M. Prato, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2011, **47**, 10182–10188. DOI: 10.1039/C8NR03036G
- 47 T. M. Sager, M. W. Wolfarth, M. Andrew, A. Hubbs, S. Friend, T. Chen, D. W. Porter, N. Wu, F. Yang, R. F. Hamilton and A. Holian, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 317–27.
- 48 Y. Zhao, B. L. Allen and A. Star, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 536–9544.
- 49 X. Liu, R. H. Hurt and A. B. Kane, *Carbon N. Y.*, 2010, **48**, 1961–1969.
- 50 J. Russier, C. Ménard-Moyon, E. Venturelli, E. Gravel, G. Marcolongo, M. Meneghetti, E. Doris and A. Bianco, *Nanoscale*, 2011, **3**, 893–896.
- 51 X. Zhuang, X. Xiang, W. Grizzle, D. Sun, S. Zhang, R. C. Axtell, S. Ju, J. Mu, L. Zhang, L. Steinman, D. Miller and H.-G. Zhang, *Mol. Ther.*, 2011, **19**, 1769–79.
- 52 J. Zhang, H. L. Zou, Q. Qing, Y. L. Yang, Q. W. Li, Z. F. Liu, X. Y. Guo and Z. L. Du, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 3712–3718.
- 53 U. J. Kim, C. A. Furtado, X. Liu, G. Chen and Peter C. Eklund, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15437–15445.
- 54 R. M. Silverstein, G. C. Bassler and T.C. Morrill, in *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th ed. New York, John Wiley and Sons, 1981.
- 55 E. F. Antunes, a. O. Lobo, E. J. Corat, V. J. Trava-Airoldi, a. a. Martin and C. Veríssimo, *Carbon N. Y.*, 2006, **44**, 2202–2211.
- 56 C. Dong, A. S. Campell, R. Eldawud, G. Perhinschi, Y. Rojanasakul and C. Z. Dinu, *Appl. Surf. Sci.*, 2013, **264**, 261–268.
- 57 A. M. Rao, P. C. Eklund, S. Bandow, A. Thess and R. E. Smalley, *Nature*, 1997, **388**, 257–259.
- 58 S. Gupta, M. Hughes, A. H. Windle and J. Robertson, *J. Appl. Phys.*, 2004, **95**, 2038–2048.
- 59 C. Bussy, A. Bianco, M. Prato and K. Kostarelos, *Nanoscale Horizons*, 2017, **2**, 284–296.
- 60 G. Poste, J. Doll, I. R. Hart and I. J. Fidler, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 1636–1644.
- 61 L. García-Hevia, F. Fernández, I. Casafont, J. C. Villegas and M. L. Fanarraga, *Biomed. Phys. Eng. Express*, 2016, **2**, 35009.
- 62 E. Flahaut, C. Laurent and A. Peigney, *Carbon N. Y.*, 2005, **43**, 375–383.
- 63 M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito and a. Jorio, *Phys. Rep.*, 2005, **409**, 47–99.
- 64 M. S. Dresselhaus and P. C. Eklund, *Adv. Phys.*, 2000, **49**, 705–814.

TOC graphic

Mild oxidation treatments improve *in vitro* and *in vivo* macrophage biodegradation of carbon nanotubes that trigger remarkable anti-tumoral effects in malignant melanoma solid tumors produced mice.



Research Article

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. Fanarraga,¹ and Lorena González-Legarreta¹ 

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

²*Amthema Lab, International Iberian Nanotechnology Laboratory, 4715-330 Braga, Portugal*

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

Received 30 April 2018; Accepted 18 October 2018; Published 4 February 2019

Academic Editor: Enrico Bergamaschi

Copyright © 2019 Carlos Renero-Lecuna et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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, (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 present a brief review of a wide range of nanomaterials (nanotubes, various nanoparticles, graphene oxide, and 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 the last term, between different laboratories.

1. 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 understanding and comparing 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 multiwalled carbon nanotube 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 multiwalled 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, functionalized, 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 are 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 it comprises 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.

2. Materials and Methods

2.1. Nanomaterials. Different nanomaterials were used in this work. High-purity MWCNTs were obtained from Nanocyl NC3100™. These nanotubes have been fully characterized 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 SL 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.

2.2. Functionalization of Nanomaterials. Nanomaterials were resuspended and functionalized 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 Vibra-Cell VCX130 Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc.), before resuspension in cell culture medium and addition to the cell cultures.

2.3. 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 the B512

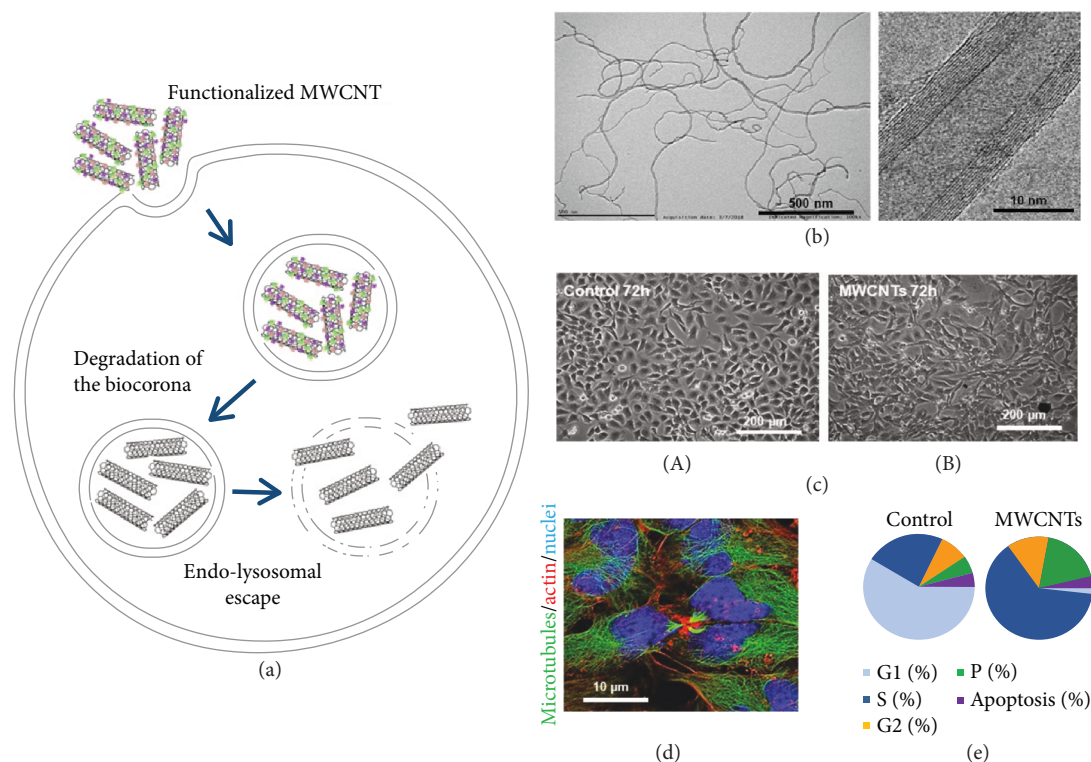


FIGURE 1: Multiwalled carbon nanotube (MWCNT) interaction with HeLa cells. (a) Diagram of their internalization and endo-lysosomal escape. (b) Low- and high-resolution TEM images of MWCNTs. (c) Phase contrast images of the control and 72 h MWCNT-exposed HeLa cells. (d) Asymmetric triple mitosis representative 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 (nondividing 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.

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.

3. Results and Discussion

3.1. 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 functionalized with serum proteins to trigger receptor-mediated endocytosis (Figure 1(a)) [38–40].

Figure 1(c) (B) 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 MWCNT-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, and (iv) the 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 MWCNT interference with DNA replication.

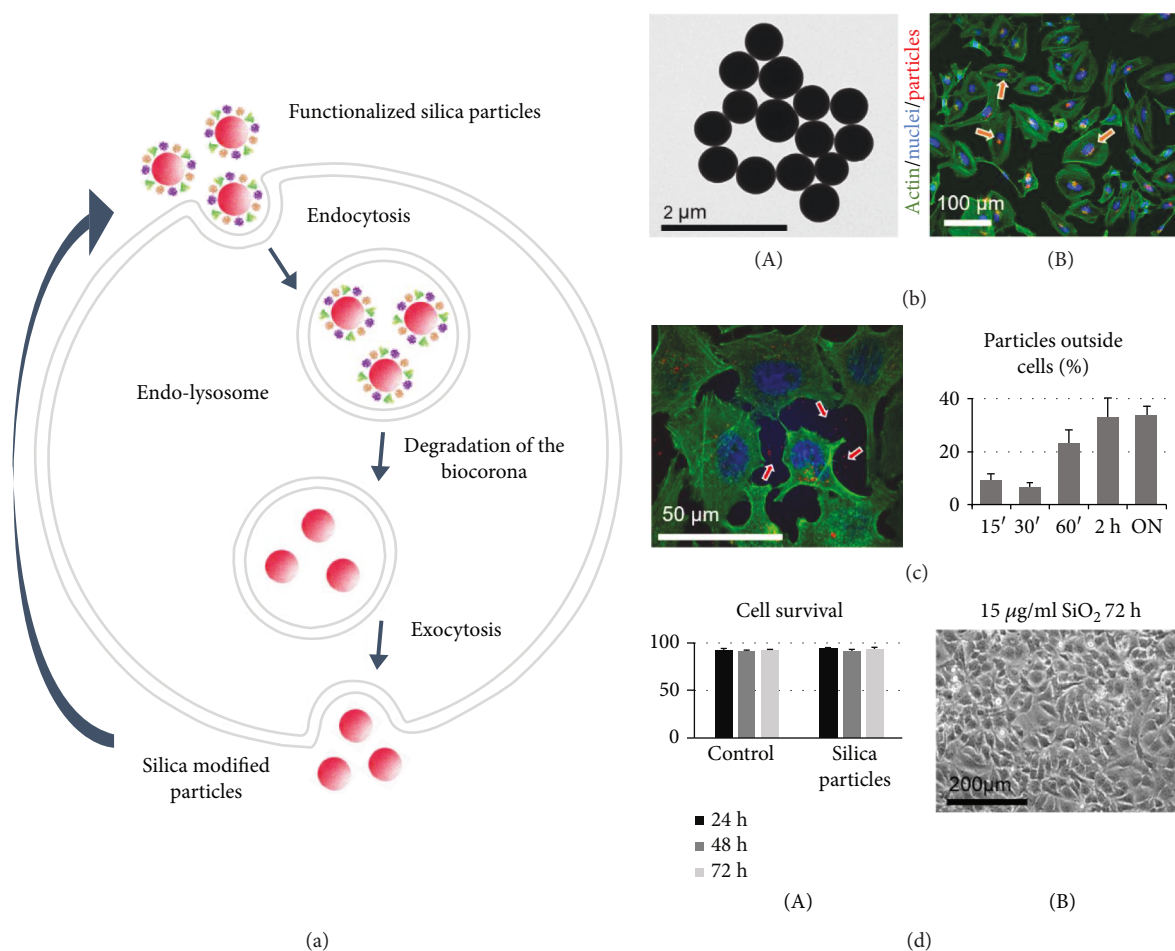


FIGURE 2: Silica particle interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of silica particles processing in HeLa cells. Particles are internalized in cells via endocytosis. In endo-lysosomes, their biocorona is degraded, and stripped particles are finally exocytosed. ((b), A) TEM characterization of the as-prepared silica particles. ((b), B) 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), A) Percentage of live cells at different exposure times. ((d), B) Phase contrast image of HeLa cells presenting no detectable cytotoxicity.

3.2. 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 functionalized with serum proteins, are receptor-mediated endocytosed. Figure 2(b) (B) shows the trajectory of these particles inside HeLa cells: particles are rapidly internalized 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 reendocytosed 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and no

significant changes in the morphology of the cells after 72 h of exposure were appreciated.

3.3. CNT-Coated Silica Particles. Carbon nanotubes can be used to coat silica particles to trigger the 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 functionalized with serum proteins, nanotube-coated silica particles also enter cells via endocytosis (Figure 3(c), A). 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), B), 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [33, 46].

3.4. Graphene Oxide (GO) Flakes. Graphene oxide is a nanomaterial that, up to date, has been reported to be quite

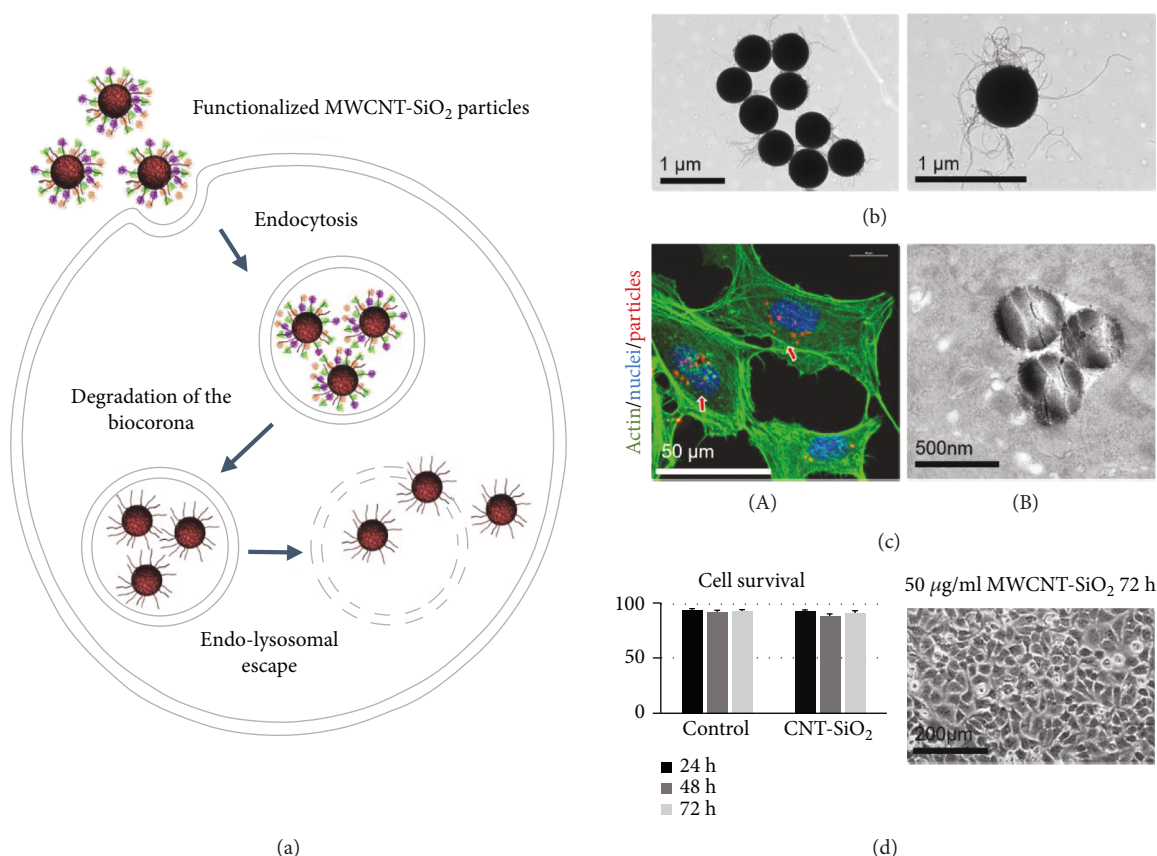


FIGURE 3: CNT-silica particle interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of CNT-silica particle trajectory in HeLa cells. Once these particles are internalized via endocytosis, the CNT biocorona is degraded. Stripped nanotubes interact with the lysosomal membrane and escape the endo-lysosomal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

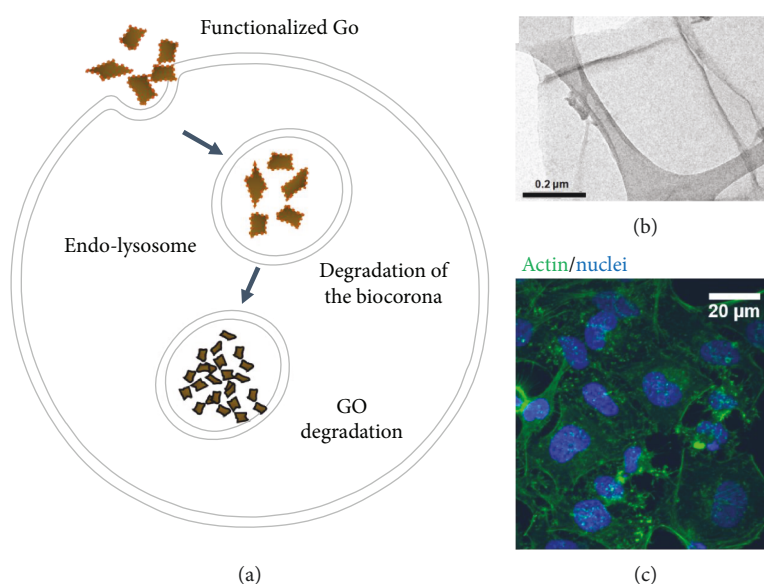


FIGURE 4: GO interaction with HeLa cells. (a) Schematic diagram of functionalized GO contacting with cellular surface receptors and invading the cell via endocytosis. Internalized GO flakes are progressively degraded in lysosomes. (b) TEM characterization of GO flakes. (c) Confocal microscopy image of HeLa cells exposed to 50 μg/ml functionalized GO flakes displaying a normal morphology after 72 h exposure.

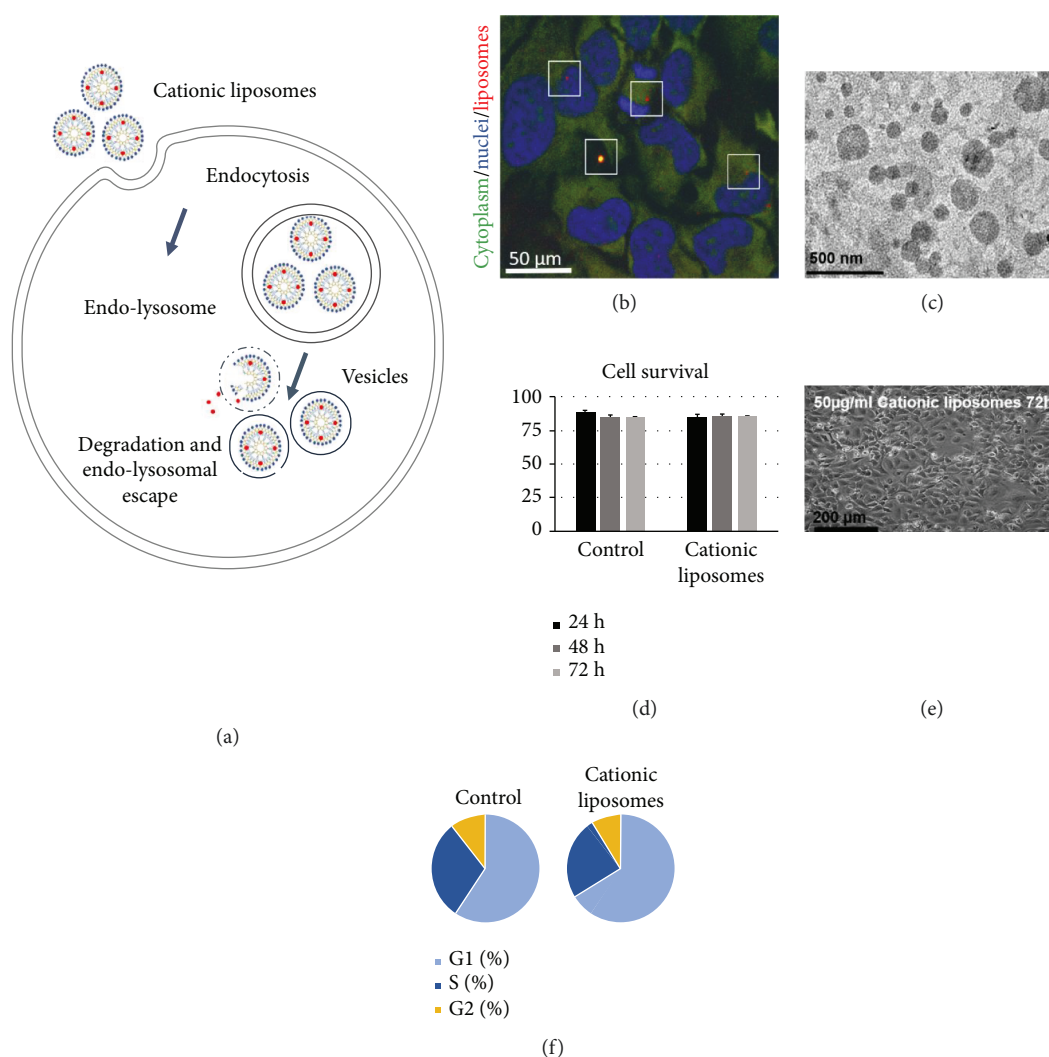


FIGURE 5: Cationic liposome interaction with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular cycle of cationic liposomes in HeLa cells. (b) Confocal microscopy image of HeLa cells exposed to Dil-labelled cationic liposomes (red channel, in boxes). (c) TEM image of the as-prepared cationic liposomes. (d) HeLa cell viability after cationic liposome exposure. (e) Phase contrast image 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.

biocompatible in different systems *in vitro* and *in vivo*. The GO composition, the flat morphology, and 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 nonoxidised 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Figure 4(b) shows a TEM micrograph of one of the GO sheets used in this study. As with carbon nanotubes, GO is functionalized by serum proteins adsorbed 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 4(c)).

3.5. 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 functionalized in 30% serum, just like the other nanomaterials. These particular types of commercial cationic liposomes (see Materials and Methods) 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)

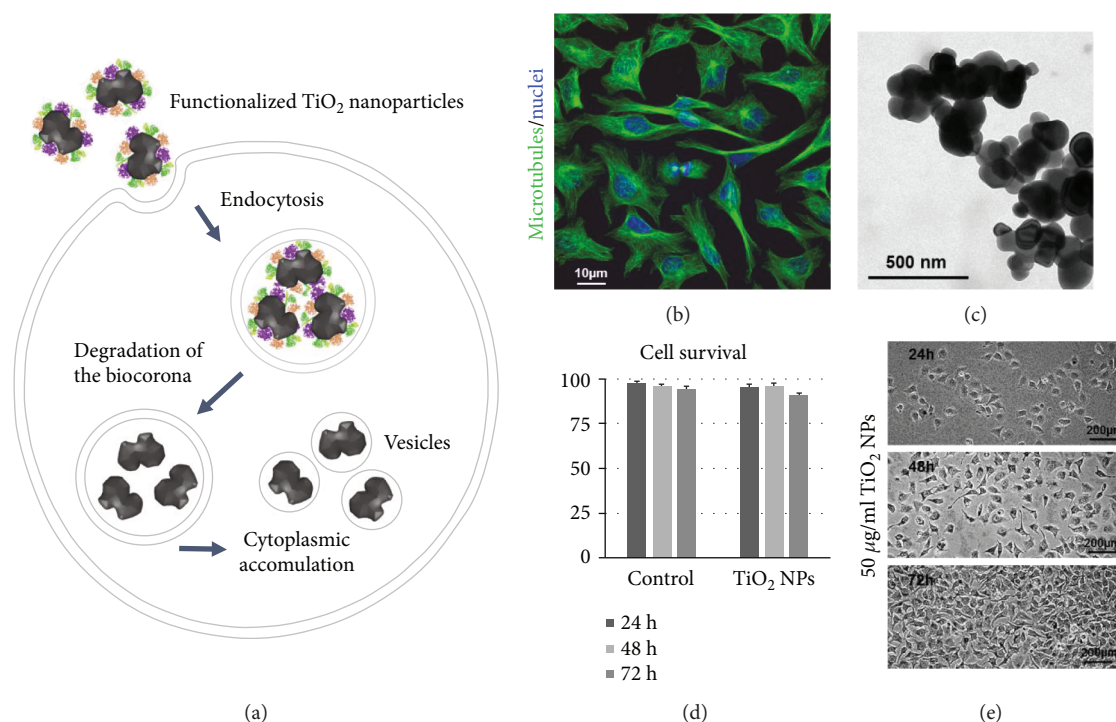


FIGURE 6: Titanium oxide nanoparticle interaction with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular trajectory of TiO₂ nanoparticles in HeLa cells. (b) Confocal microscopy images of HeLa cells exposed to TiO₂ nanoparticles where no morphological changes are observed. (c) TEM images of the 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.

(boxes) shows 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 (Figures 5(d) and 5(f)).

3.6. 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 negative controls in several studies [55]. However, there are increasing evidences in *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 display no observable effects [57]. Figure 6 shows a summary of the findings in HeLa cells exposed to serum-functionalized 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 there 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.

3.7. 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, 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 captures 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

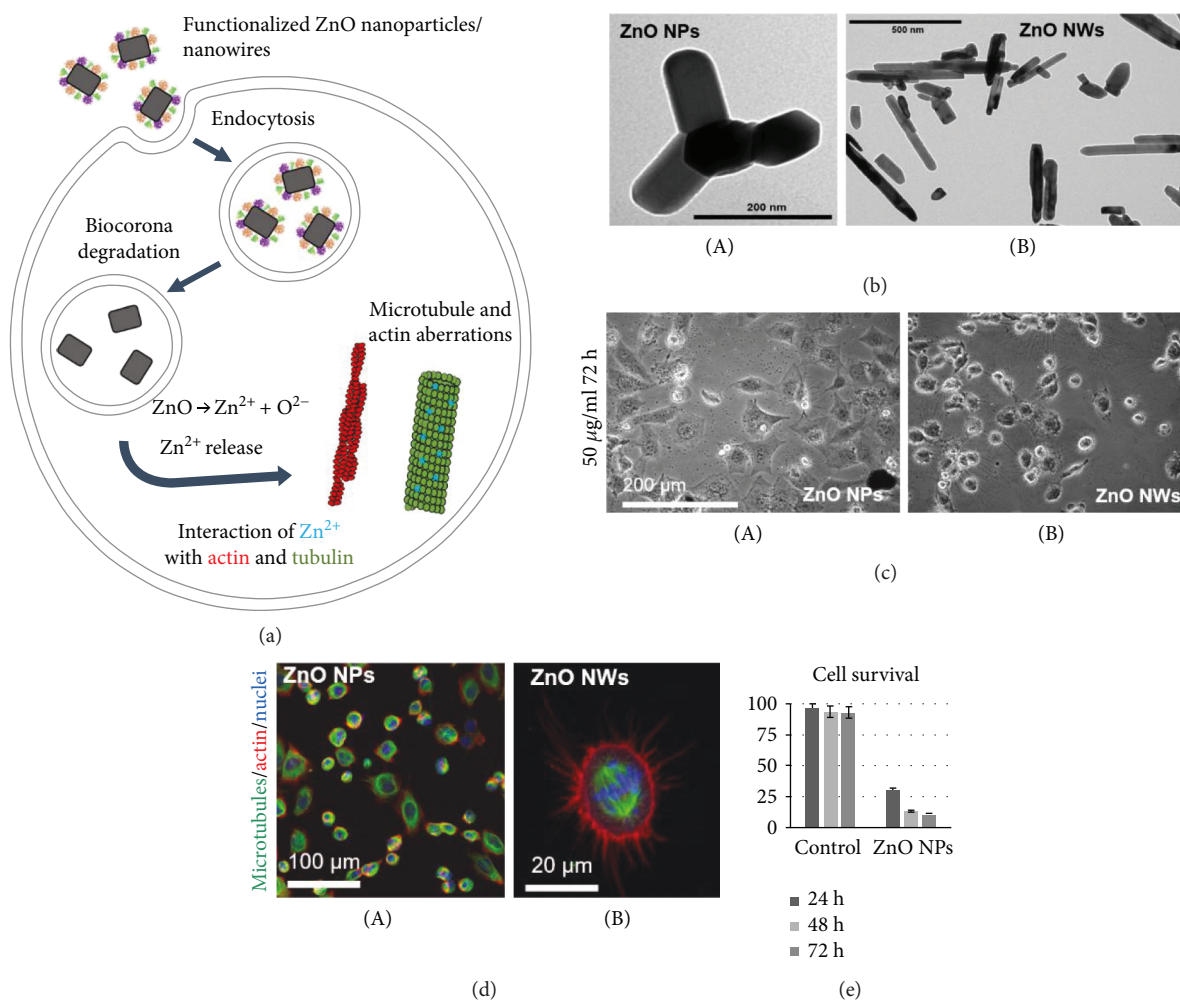


FIGURE 7: Interaction of ZnO nanoparticles and nanowires with HeLa cells. (a) Graphic illustration of the intracellular cycle of ZnO nanomaterials in HeLa cells. (b) TEM characterization of ZnO nanoparticles (A) and nanowires (B). (c) Phase contrast images of HeLa cells exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ZnO nanoparticles (A) and nanowires (B) during 72 h. (d) Confocal microscopy images demonstrating the cytotoxic effects of ZnO nanoparticles (A) and nanowires (B) of HeLa cells. Cytoskeletal abnormalities are clearly visible. (e) HeLa cell viability after ZnO nanoparticle exposure.

the cell membrane causing immediate cell necrosis. This effect can be seen in the immunofluorescence image from Figure 7(d) (A).

$\text{ZnO}:\text{Co}^{2+}$ nanowires caused very similar effect to ZnO nanoparticles despite the different morphology and composition. These nanomaterials functionalized with serum proteins interact with membrane receptors, trigger endocytosis, and finally, dissolve in the lysosomes virtually identical to ZnO nanoparticles [57, 65]. As observed for the ZnO nanoparticles, these nanowires produced changes in the microtubule and actin cytoskeletons (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), B).

4. Conclusions

Our work shows how the toxicological effects of nanomaterials can result from 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 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 it is its composition and their chemical properties which trigger 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 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.

Data Availability

All data used to support the findings of this study are included within the article and can be provided by the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

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

Funding

CRL is funded by FJCI-2015-25306; LGL is funded by CD17/00105; LVF is funded by FPU 15/06881.

Acknowledgments

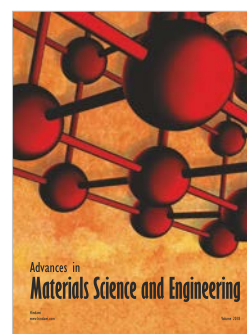
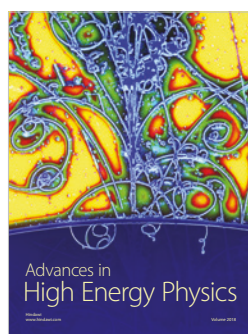
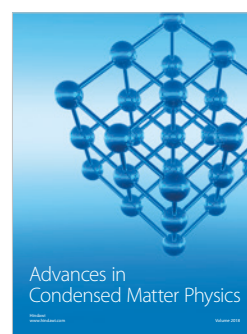
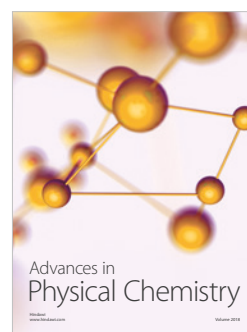
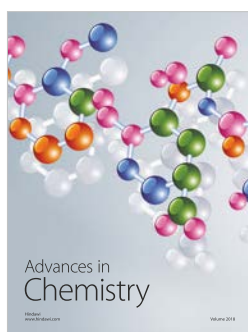
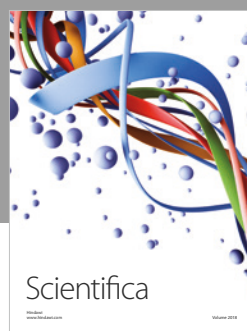
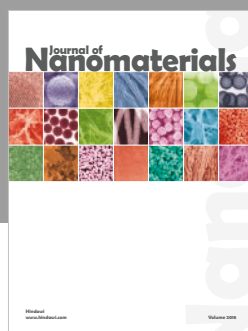
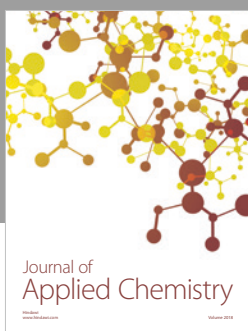
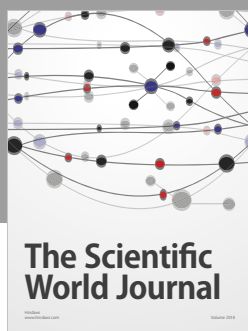
This work has been supported by the Spanish MINECO and European FEDER under Project ref. PI16/00496, the Nano-BioApp Network Ref. MINECO-17-MAT2016-81955-REDT. We thank IDIVAL for INNVAL15/16, INNVAL 17/11, PREVAL 16/03, 16/02, and the Raman4clinics BMBS COST Actions BM1401 and TD1402. We also thank Débora Muñoz for her technical assistance. We are grateful to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit and the TEM Unit of the IDIVAL Institute.

References

- [1] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, and N. von Goetz, "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products," *Environmental Science & Technology*, vol. 46, no. 4, pp. 2242–2250, 2012.
- [2] S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberets et al., "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 et al., "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, supplement 1, pp. 57–71, 2013.
- [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. Gonzalez, J. Fernandez-Luna, J. Villegas, and M. Fanarraga, "Anti-cancer cytotoxic effects of multiwalled carbon nanotubes," *Current Pharmaceutical Design*, 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," *Advanced Healthcare Materials*, 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 et al., "Microglia determine brain region-specific neurotoxic responses to chemically functionalized 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," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 166, supplement_1, pp. S4–S8, 2002.
- [12] S. Diment and P. Stahl, "Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands," *Journal of Biological Chemistry*, 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: cyto and genotoxicity and electron microscopy," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 722, no. 1, pp. 20–31, 2011.
- [14] L. García-Hevia, J. C. Villegas, F. Fernández et al., "Multiwalled carbon nanotubes inhibit tumor progression in a mouse model," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, no. 9, pp. 1080–1087, 2016.
- [15] L. García-Hevia, R. Valiente, J. L. Fernández-Luna et al., "Inhibition of cancer cell migration by multiwalled carbon nanotubes," *Advanced Healthcare Materials*, 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," *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 1, pp. 242–250, 2011.
- [17] E. S. Patchin, D. S. Anderson, R. M. Silva et al., "Size-dependent deposition, translocation, and microglial activation of inhaled silver nanoparticles in the rodent nose and brain," *Environmental Health Perspectives*, 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 et al., "Carbon nanotube uptake changes the biomechanical properties of human lung

- epithelial cells in a time-dependent manner," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, no. 19, pp. 3983–3992, 2015.
- [20] S. K. Manna, S. Sarkar, J. Barr et al., "Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- κ B in human keratinocytes," *Nano Letters*, 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] A. Seifalian, Madani, Shabani, and M. Dwek, "Conjugation of quantum dots on carbon nanotubes for medical diagnosis and treatment," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, no. 1, 2013.
 - [24] H. Ali-Boucetta, K. T. Al-Jamal, and K. Kostarelos, "Cytotoxic assessment of carbon nanotube interaction with cell cultures," *Methods in Molecular Biology*, 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 Research*, vol. 34, no. 13, pp. 3670–3676, 2006.
 - [26] J. Cveticanin, G. Joksic, A. Leskovic, S. Petrovic, A. V. Sobot, and O. Neskovic, "Using carbon nanotubes to induce micro-nuclei and double strand breaks of the DNA in human cells," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 1, article 015102, 2010.
 - [27] F. Pampaloni and E. L. Florin, "Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 6, pp. 302–310, 2008.
 - [28] J. R. Masters, "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 315–319, 2002.
 - [29] J. J. M. Landry, P. T. Pyl, T. Rausch et al., "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line," *G3: Genes, Genomes, Genetics*, vol. 3, no. 8, pp. 1213–1224, 2013.
 - [30] D. Mittelman and J. H. Wilson, "The fractured genome of HeLa cells," *Genome Biology*, vol. 14, no. 4, p. 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," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, article 23328, 2016.
 - [32] E. González-Domínguez, N. Iturriz-Rodríguez, E. Padín-González et al., "Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6317–6328, 2017.
 - [33] N. Iturriz-Rodríguez, E. González-Domínguez, E. González-Lavado et al., "A biomimetic escape strategy for cytoplasm invasion by synthetic particles," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 56, no. 44, pp. 13736–13740, 2017.
 - [34] C. Renero-Lecuna, R. Martín-Rodríguez, J. A. González et al., "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," *Chemistry of Materials*, vol. 26, no. 2, pp. 1100–1107, 2013.
 - [35] L. E. Greene, B. D. Yugas, M. Law, D. Zitoun, and P. Yang, "Solution-grown zinc oxide nanowires," *Inorganic Chemistry*, vol. 45, no. 19, pp. 7535–7543, 2006.
 - [36] L. E. Greene, M. Law, J. Goldberger et al., "Low-temperature wafer-scale production of ZnO nanowire arrays," *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, vol. 42, no. 26, pp. 3031–3034, 2003.
 - [37] M. F. L. 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. 535–539, 2013.
 - [38] N. W. Shi Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, and H. Dai, "Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells," *Journal of the American Chemical Society*, 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. Dahl, "Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 45, 2011.
 - [40] C. Iancu, L. Mocan, C. Bele et al., "Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalised with human serum albumin," *International Journal of 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," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, no. 1, p. 57, 2013.
 - [43] J. Muller, I. Decordier, P. H. Hoet et al., "Clastogenic and aneuploidic 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 et al., "Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast," *Nano Letters*, 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," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 4, article 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 Letters*, 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," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 15, pp. 1921–1932, 2013.
 - [48] M. Zhang, M. Yang, C. Bussy, S. Iijima, K. Kostarelos, and M. Yudasaka, "Biodegradation of carbon nanohorns in macrophage cells," *Nanoscale*, vol. 7, no. 7, pp. 2834–2840, 2015.
 - [49] A. R. Sureshbabu, R. Kurapati, J. Russier et al., "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 functionalized 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,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 4, pp. 1745–1761, 2010.
- [52] M. Przybylo, D. Glogocka, J. W. Dobrucki et al., “The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 85, pp. 39–46, 2016.
- [53] B. Chatin, M. Mével, J. Devallière et al., “Liposome-based formulation for intracellular delivery of functional proteins,” *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 4, article e244, 2015.
- [54] X.-X. Chen, B. Cheng, Y. X. Yang et al., “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*, pp. 121–137, Elsevier, 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,” *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 1, pp. 231–241, 2011.
- [57] L. García-Hevia, R. Valiente, R. Martín-Rodríguez et al., “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,” *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 64, no. 4, pp. 1268–1273, 1991.
- [59] Y. Xu, M. T. Wei, H. D. Ou-Yang et al., “Exposure to TiO₂ nanoparticles increases Staphylococcus aureus infection of HeLa cells,” *Journal of 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 Research Letters*, 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 and Chemical Toxicology*, 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, 2011.
- [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. S. Xu, and Z. L. Wang, “Dissolving behavior and stability of ZnO wires in biofluids: a study on biodegradability and biocompatibility of ZnO nanostructures,” *Advanced Materials*, vol. 18, no. 18, pp. 2432–2435, 2006.
- [65] K. H. Müller, J. Kulkarni, M. Motskin et al., “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.



Controlled drug delivery systems for cancer based on mesoporous silica nanoparticles

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine

5

Nerea Iturrioz-Rodríguez¹
Miguel A Correa-Duarte^{2,3}
Mónica L Fanarraga¹

¹Grupo de Nanomedicina, Universidad de Cantabria – IDIVAL, Santander 39011, Spain; ²Department of Physical Chemistry, Center for Biomedical Research (CINBIO), Southern Galicia Institute of Health Research (IISGS), Vigo 36310, Spain; ³Biomedical Research Networking Center for Mental Health (CIBERSAM), Universidade de Vigo, Vigo 36310, Spain

AQ2

Abstract: The implementation of nanotechnology in medicine has opened new research horizons particularly in the field of therapeutic delivery. Mesoporous silica particles have emerged as biocompatible drug delivery systems with an enormous potential in the treatment of cancer among many other pathologies. In this review, we focus on the unique properties of these particles as chemotherapy delivery carriers. Here, we summarize the general characteristics of these nanomaterials – including their physicochemical properties and customizable surfaces – different stimuli that can be used to trigger targeted drug release, biocompatibility and finally, the drawbacks of these types of nanomaterials, highlighting some of the most important features of mesoporous silica nanoparticles in drug delivery.

10

Keywords: nanocarrier, drug release, targeted drug delivery, biocompatibility, biodegradability, tumour

AQ7

Introduction

15

Chemotherapy, together with surgery, are the most used cancer treatments in oncology. Unfortunately, chemotherapeutic agents are applied systemically destroying both tumor and healthy cells and resulting in many of undesirable side effects.¹ Encapsulated drug delivery systems offer the possibility to target therapies locally at adequate concentrations, maximizing the effect against cancer cells while reducing the side effects and cytotoxicity in healthy cells.² In this sense, nanotechnology can help with the design of target-specific and controlled delivery systems, capable of transporting enough therapies to specific cells, releasing the drug in a controlled manner.²

20

AQ3

Different types of nanomaterials have been used as targeted carriers. Among others, the most employed are liposomes,^{3,4} polymeric micelles,^{5,6} carbon nanotubes,⁷ dendrimers,^{8–10} inorganic particles¹¹ and silica-based materials^{12,13} (Figure 1). Recently, mesoporous silica particles (MSPs) have attracted much attention due to their singular properties.¹⁴ Here we discuss some of their characteristics and advantages in cancer drug delivery.¹⁵

25

30

Physicochemical properties of MSPs

MSPs have a well-defined internal mesopore structure (from 2 to 10 nm of diameter) with a large pore volume (0.6–1 cm³/g) and a high surface area (700–1,000 m²/g). Their size, nano- (50 nm) to submicron-scale (500 nm),¹⁶ as well as their shape¹⁷ and surface¹⁸ can be custom-designed offering many different possibilities for the loading of anticancer drugs such as docetaxel,¹⁹ paclitaxel²⁰ or doxorubicin,²¹ among many

35

Correspondence: Mónica L Fanarraga
Grupo de Nanomedicina, Universidad de Cantabria – IDIVAL, Santander 39011, Spain
Tel +34 94 220 2067
Fax +34 94 220 1945
Email fanarrag@unican.es

AQ1

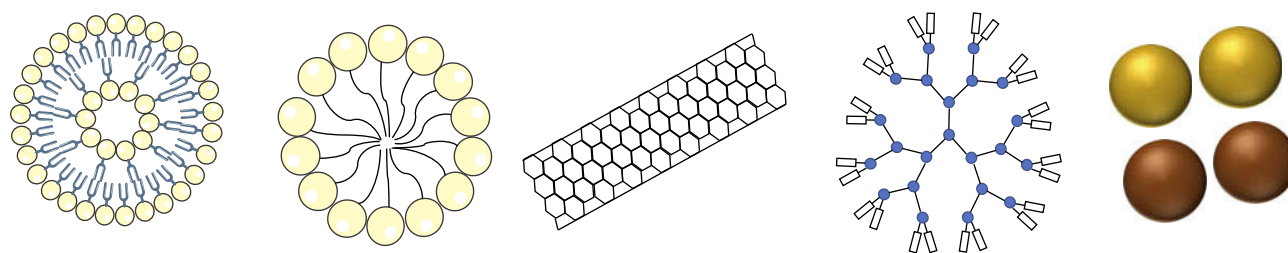


Figure 1 Schematic representation of different delivery systems. From left to right; liposomes, micelles, carbon nanotubes, dendrimer and gold (yellow) and iron (brown) nanoparticles.

others. Moreover, the cytotoxicity of these particles and cellular uptake have been demonstrated to be dependent on nanoparticle size and surface charge. Indeed, 15 nm diameter particles have been reported to trigger more cytotoxicity than 100 nm diameter particles in endothelial cells.²² Lu and collaborators showed that 50 nm diameter particles are the optimal for cellular uptake.²³ When considering the particle surface charge, cationic silica particles appear to be more cytotoxic and have a faster cellular uptake than anionic or neutral silica particles.^{24,25} Davila-Ibáñez and co-workers used magnetic silica nanoparticles with DNA attached to the silica network to show how charges at the surface of the nanoparticles is a key issue to guarantee the cellular uptake.^{26,27} On the other hand, particles with a neutral charge do not appear to internalize the cell membrane of Caco-2 cells.

Targeting the cell/tissue of interest

One of the most important goals to achieve in drug delivery is the possibility of targeting nanoparticles to a specific cell or tissue. In this regard, most nanomaterials including MSPs, have been reported to passively target solid tumors. Typically, when a tumor reaches a certain size, the normal vasculature present in the tumoural organ cannot irrigate all the cellular mass. This effect generates intra-tumoural hypoxia triggering the segregation of growth factors that activate the rapid sprouting of new blood vessels from the surrounding capillaries.²⁸ This process known as angiogenesis generates irregular blood vessels displaying a discontinuous epithelium with an absent basal membrane.²⁹ When blood components reach these abnormal and discontinuous vascular networks, the fenestrations between the endothelial cells offer little resistance to the extravasation of nanomaterials inside of the tumor.³⁰ Particles/molecules smaller than 4 nm diffuse through the capillary endothelium back to the blood circulation and are reabsorbed,³¹ but macromolecules and nanomaterials do not naturally return to the blood vessels, accumulating in

the perivascular tumoural space. In the nanomedicine field, this phenomenon is known as the Enhanced Permeability and Retention effect or “EPR” effect (Figure 2). The study carried out by Lee and co-workers, showed how MSPs decorated with multiple magnetite nanocrystals loaded with Doxorubicin (DOX), induced efficient cell death in a melanoma model, confirming in vivo passive targeting and accumulation of the nanoparticles in the tumor site.³² Huan and colleagues used MSPs functionalized with polyethyleneimine/polyethylene glycol (PEI/PEG) to carry doxorubicin together with P-glycoprotein siRNA. Their study demonstrated that these particles were effectively biodistributed, achieving an 8% of the enhanced permeability and retention effect at the tumor site in vivo.³³ But there are many more examples in the literature.

MSPs can also be functionalized to actively target tumors. One of the strategies used to reach this goal consists in the attachment of different ligand molecules – such as peptides, antibodies,³⁴ aptamers,³⁵ growth factors,³⁶ vitamins, etc. – on their surface, so the particles interact with receptors on the cellular surface (Figure 3).³⁷ This way, the entry mechanism of the nanodevice will be *via* receptor-mediated endocytosis, and the particle will be captured inside the endosomal membranes.³⁷ In the study carried out by Kayuan and colleagues, HB5 aptamer-functionalized mesoporous silica-carbon-based DOX-loaded systems (MSCN-PEG-HB5/DOX) were used in vitro for chemophotothermal combined therapy in Human Epithelial growth factor Receptor 2 (HER2)-positive breast cancer cells. This study demonstrates how HER2-positive breast cancer cells uptake these particles with more avidity than normal breast epithelial cells (MCF-10A). Additionally, cytotoxicity experiments demonstrated that combined therapy induces highest cell killing effect compared to chemotherapy and photothermal therapy by itself.³⁸ Jianbin and colleagues showed how MSPs of 40 nm size, loaded with DOX and functionalized with selective α - β 3 integrin ligands on their surface displayed an enhanced targeting effect through the

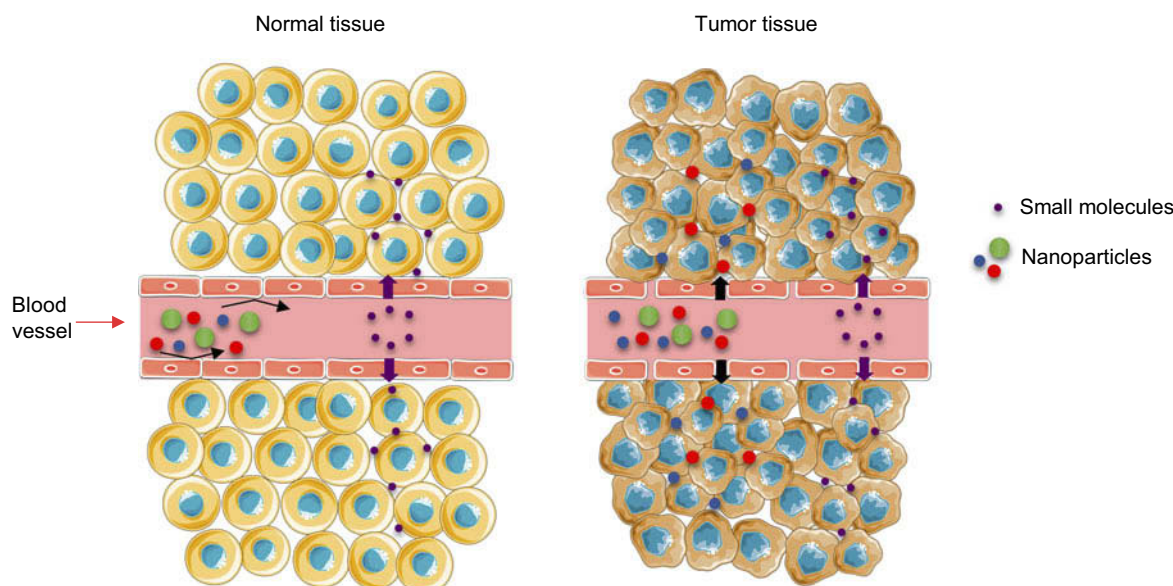


Figure 2 Image representing the blood transport mechanism of nanomaterials or molecules from normal tissue (left) and the enhanced permeability and retention effect in a tumor.

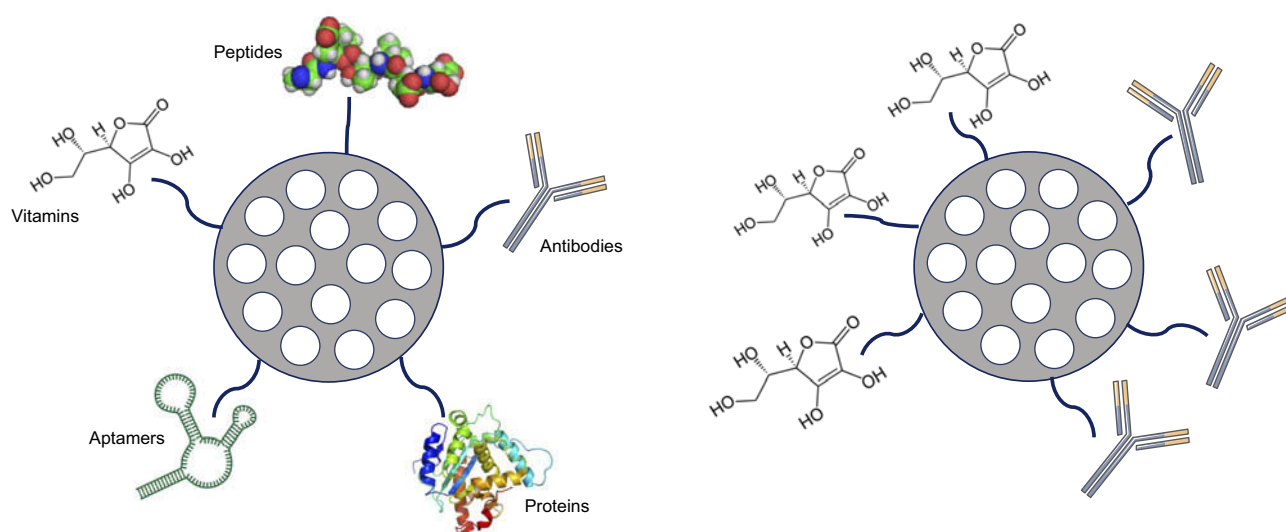


Figure 3 Schematic description of active targeting possibilities on mesoporous silica particles (left). Dual targeting example (right).

blood–brain barrier, penetrating glioblastoma cells. In summary, these targeted particles rapidly invaded cancer cells, delivering the drug intracellularly and improving the anticancer activity of the free drug. MSPs achieve satisfactory anti-glioblastoma efficacy avoiding toxic side effects in the healthy brain tissue thus, demonstrating active cell targeting.³⁹

Controlling drug release: gatekeepers

Another challenge in the design of nanotransporters is delivering the drug at the precise moment when the carrier

reaches the tumor, or alternatively, when a signal is provided. MSPs are useful carrier systems due to their high surface and tunable porous structure. Drugs can be loaded inside their mesopores through simple diffusion mechanism. But, one of the main advantages of MSPs is the possibility to design “zero release” nanosystems by blocking the MSP pores using gatekeepers.^{13,40}

Once in the tumor, different internal or external stimuli can be employed to activate drug delivery. Some of the intra-tumoural stimuli used are the local pH conditions, the enzymes in the peritumoral tissue or the redox potential.

Table 1 Different gatekeepers that can be used to maintain the “zero release” of the drug and to trigger drug release

External stimuli				Internal stimuli				
Magnetic field		Light		pH Sensitive systems		Redox sensitive systems		Enzyme sensitive systems
Magnetic particles	Magnetic nanocrystal	Gold nano-particles	Photolabile molecules	Polyelectrolytes	Ester bond	Acetal bond	Peptides	Disulfide bond

In addition, external stimuli such as magnetic fields or light can also be applied to activate “on demand” drug release (Table 1, Figure 4).

Internal stimuli triggering drug delivery

The characteristics of the tumoural environment can help in the design of nanocarriers sensitive to internal or endogenous stimuli to ensure a controlled localized drug release.

- pH-sensitive systems

One general feature of solid tumors is the presence of acidity in the tumor environment due to the “Warburg effect”. Healthy cells use the mitochondrial oxidative phosphorylation to produce energy. However, most cancer cells activate the glycolytic route.^{41,42} This process, also known as

anaerobic glycolysis, is less efficient in terms of energy (adenosine triphosphate) production and increases the generation of additional metabolites – mostly lactic acid – generating local tumoural acidosis which can be beneficial for tumor proliferating cells.^{41,42}

An effective strategy to control drug release is blocking the MSP pores with noncovalently bonded pH sensible polymers. Different polymers can be selected so they detach from the particle at low pH, releasing the drug at the tumoral site. Among these systems, one of the most commonly used methods is based on polyelectrolyte multilayers. These gatekeepers are based on the layer-by-layer technique (Figure 5).^{43–45} The composition, thickness or the molecular organization of the layers⁴⁶ and the permeability/elasticity of the polymers can be

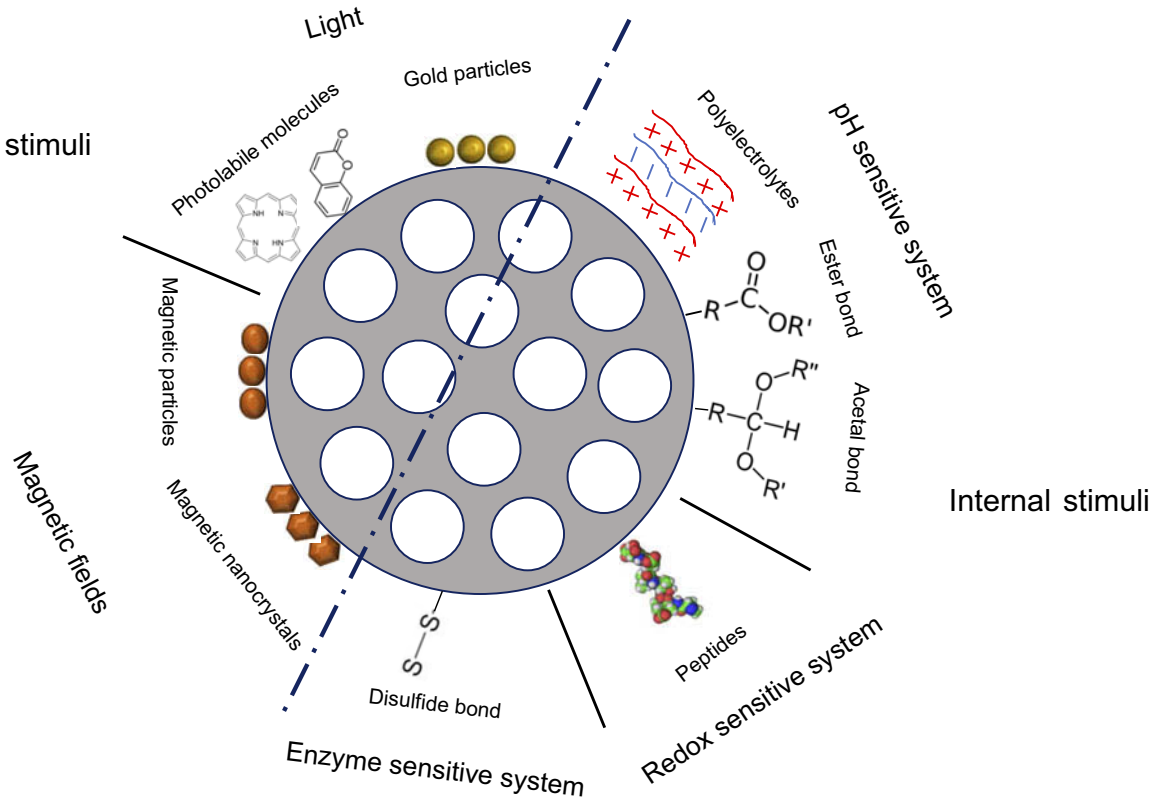


Figure 4 Examples of different gatekeepers that can be used to maintain the “zero release” of the drug inside mesoporous silica particles and to trigger on demand the release.

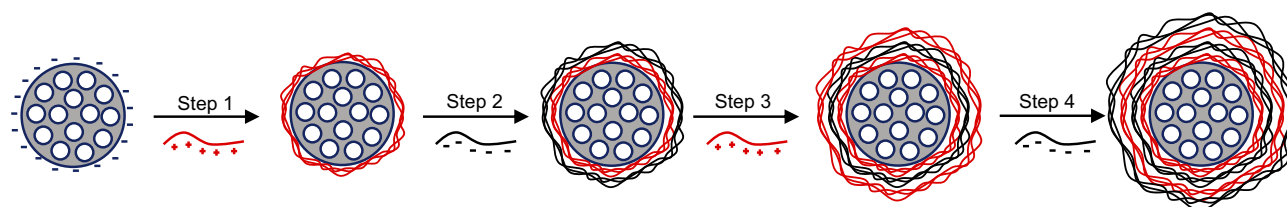


Figure 5 Scheme of the layer by layer technique in mesoporous silica particles.

modified so the system can be easily “tuned”.⁴⁷ Feng et al synthesized MSPs coated with multilayers of Poly(Allylamine Hydrochloride) (PAH) and Poly(Styrene Sulfonate) (PSS) polyelectrolytes, loaded with DOX inside the pores.⁴⁸ In this study, they demonstrated that the delivery of the drug was both pH and layer thickness dependent, and that the layer thickness has an exponential relationship with the number of polymer coats applied. This study also demonstrates that i) the biodistribution of the drug in vivo was smaller in major organs compared to that of free DOX, and that ii) these particles had lower systemic toxicity than free DOX, thus, concluding that these MSP-based nanoparticles were a good carrier system with high efficiency and low systemic toxicity. Also, Sun et al used multilayer-coated MSPs to load cisplatin and Rhodamine B (RhB).⁴⁹ The outer polyelectrolyte multilayer was assembled from the cationic polyelectrolyte PAH, and a second negatively charged polyelectrolyte, P(DMA-co-TPAMA), consisting of N,N-Dimethylacrylamide (DMA) and 3,4,5,6-Tetrahydrophthalic Anhydride functionalized N-(3-Aminopropyl) Methacrylamide (TPAMA) monomer units, that exhibited pH-induced charge conversion characteristics. This way, cisplatin and rhodamine B were released in the tumor microenvironment upon a pH reduction from 7.4 to 5–6, typical in malignant tumors. Other interesting gatekeeper systems are based on pH-sensitive linkers. These linkers are cleaved in acidic conditions, triggering the release of the cargo from the carrier. Acetal bonds,^{50–52} hydrazine bonds,^{53–55} hydrazone bonds^{56,57} or ester bonds^{58,59} are some examples that have been used worldwide. In a study carried out by Ze-Yong Li et al, DOX was conjugated to MSPs using hydrazine bonds.⁶⁰ They proved that when the particles were in vitro incubated at pH 6.5, a fast DOX release occurred due to the hydrolysis of the bonds. Lee et al were able to attach DOX to the inner wall of MSPs and release this drug in the endolysosomes of cancer cells in the liver.⁶¹ The conjugation of the drug was done by hydrazone bonds that released the drug upon endo-lysosomal maturation when the pH of the vesicles decreased.

• Enzyme-responsive systems

Compared to healthy tissues or cells, many different enzymes, mostly proteases, are overexpressed by cancer cells.⁶² This peculiarity can also be an interesting stimulus to trigger enzyme-mediated drug release.⁶³ The development of enzyme-released drug delivery systems based on MSPs has caught much attention. Liu et al used in their study a Matrix-Metalloproteinase (MMPs) responsive drug delivery system based on MSPs to reduce in vivo side effects of traditional chemotherapies.⁶⁴ MSPs were loaded with DOX and coated with bovine serum albumin as an end-cap to seal the mesopores of the nanoparticles, using lactobionic acid as the targeting motif. The in vivo experiments showed that the DOX delivery system could be used to inhibit tumoural growth in mice with minimal side effects.

• Redox-sensitive systems

Glutathione (GSH) is the most abundant non-protein thiol that acts as a reducing agent maintaining enzymes in an active state. In cancer cells, the intracellular concentration of GSH is three times higher than in normal cells.⁶⁵ Hence, this is a good tool to prompt the release of drugs. Disulfide bonds^{66–70} (S-S) can be easily cleaved in the presence of GSH for being a redox-sensitive group, so they can be used to form capped systems with nanoparticles^{71,72} or polymers^{69,73,74} for instance. Gong et al were able to synthesize MSPs functionalized with polyethylene glycol using a disulfide bond linker.⁷⁴ These authors demonstrate drug release upon GSH rise, while low GSH concentrations blocked the release. Apart from PEG,^{75,76} poly N-acryloxysuccinimide⁷⁷ has also been used as an efficient method to deliver hydrophilic drugs to cancer cells improving the efficacy of the therapy.

External stimuli for drug delivery

Magnetic fields and light are external stimuli also used to control gatekeepers. Although these stimuli are less popular than endogenous stimuli, they are more reproducible and do not depend on the heterogeneous physiological conditions of the tumoural environment. Besides, these systems can be more precise in local drug release, minimizing toxicity and side effects.⁷⁸ The two main strategies of these drug delivery systems are based on are magnetic fields and light.

Magnetic fields. These drug delivery systems are based on the use of magnetic fields as external stimuli to guide the particles to the tumor environment and to locally increase the temperature, triggering cell death by controlled drug release and/or hyperthermia.⁷⁹ Superparamagnetic iron oxide nanoparticles are the most used magnetic nanoparticles. They exhibit an extraordinary capacity to convert magnetic energy into heat.^{80,81} This ability allows the use of thermo-sensitive materials as gatekeepers capping the surface of MSPs, provoking the opening of the pores and the release of a drug using magnetic fields.^{82,83} Baeza and colleagues used a nanodevice based on MSPs with iron oxide nanocrystals inside the silica matrix.⁸³ This device was coated with a copolymer of Poly(Ethyleneimine)-b-Poly (N Isopropylacrylamide) (PEI/NIPAM), which acts as a temperature-sensitive gatekeeper and retains proteins into the polymer shell linked by electrostatic forces or hydrogen bonds. Once these nanodevices are administered into cancer cells, an alternative magnetic field is applied. The results demonstrate that the polymer can act as a gatekeeper, opening or closing the pores of the silica matrix, controlling the release of the macromolecules attached to the polymer branches. Moreover, Thomas et al used in their study DOX-loaded MSPs combined with magnetic nanocrystals that have been surface-modified with pseudorotaxanes.⁸⁴ After the application of a magnetic field, the nanocrystals generate heat, causing the disassembly of the pseudorotaxanes, triggering the release of DOX and consequently, a cytotoxic effect in breast cancer cells.

Light. Among the external stimulus, light is a rapid, non-invasive, clean and efficient stimulus that can be used to control drug delivery with high spatial and temporal resolution.^{85,86} Although most photoreactions used in drug delivery were induced by UV light,^{85,87,88} the best wavelengths for good tissue penetration are those in the close IR, between 800 and 1,100 nm, which correspond to the so-called “water biological window”.⁸⁹ The mechanism of these types of carriers to trigger drug release is based on the photo-sensitiveness of the gatekeeper that changes conformation upon light application. Guardado-Alvarez et al used MSPs with photolabile coumarin-based molecules capping the surface, noncovalently conjugated

β -cyclodextrin to block the pores and rhodamine B inside the pores.⁹⁰ This way, 800-nm two-photon excitation triggered the release of the bond holding the coumarin to the nanopore releasing both the β -cyclodextrin cap and the cargo. Martínez-Carmona and colleagues carried another study in vitro using an MSP-based device with porphyrin-caps attached with reactive oxygen species (ROS)-cleavable linkages.⁹¹ These bonds are sensitive to singlet-oxygen produced after exposure to visible light, releasing the cargo (Topotecan). The oxygen molecules produced by the porphyrin–nanocaps break the sensitive-linker uncapping the pores and releasing the entrapped drug. These particles have been used in osteosarcoma cancer cells demonstrating a controlled release of Topotecan inside the tumor cells. Another light-sensitive gatekeeper type is based on gold nanoparticles (AuNPs). These particles, combined with MSPs, are attractive devices for cancer cell imaging⁹²⁻⁹⁴ and can also heat when irradiated with a laser producing a photothermal effect.⁹³ As for the magnetic nanoparticles, the heat generated upon light exposure can be used to release the anti-cancer therapy and/or trigger drug release. Wang and colleagues, for instance, designed a therapeutic delivery system, based on MSPs closed by AuNPs with RhB as the cargo.⁹⁵ This carrier was studied in vitro showing a good release of the RhB when temperature increased. In the study done by Vivero-Escoto et al AuNP-capped-MSPs were useful to release a chemotherapeutic such as paclitaxel in human fibroblast and liver cells.⁹⁶ This release could be easily controlled by low-power photoirradiation under physiological conditions.

Concerning the use of internal and external stimuli, it is important to mention the combination of both types of stimuli, light and alternating magnetic fields, to generate heat, to induce local hyperthermia increasing the pH⁹⁷ and the enzymatic activity⁹⁸ of the cells. Hence, this type of structured nanomaterials can be used as an interesting system for programmed site-specific drug delivery.

Triggering endolysosomal escape

Upon receptor-mediated endocytosis, MSPs are incorporated inside the endolysosomal membranes. Many nanoparticles after intracellular transit are eventually expelled from the cells by exocytosis.⁹⁹⁻¹⁰¹ Thus, to avoid therapy degradation in the lysosomal due to the hostile chemical conditions and/or, exocytosis, nanocarriers need to escape into the cytoplasm. Thus far, different strategies that have been developed to trigger lysosomal escape among these, the proton sponge effect¹⁰² and destabilization of the endosomal membrane are the most used.¹⁰³ The first mechanism is based on the swelling of the vesicle, and the second, in the creation of pores that enable therapeutic release into the cytoplasm.

The proton sponge effect

This effect relies on the rise of the proton concentration during hydrolysis that, in turn, causes an increase in the membrane potential, osmotic swelling and finally endo-lysosome bursting.¹⁰⁴ This phenomenon occurs when polyplexes such as PEI or PAMAM are endocytosed. The amine groups of these molecules capture protons that accumulate in endosomes, gradually increasing the membrane potential and breaking the lysosomal membrane equilibrium. The diffusion of Cl^- molecules into endosomes cause the increase of the osmotic pressure, swelling, expanding and finally tearing the lipid bilayer of the endolysosome, releasing the contents into the cytoplasm (Figure 6).¹⁰² The MSPs used by Wu et al could release siRNA and DOX into the cytoplasm of breast cancer cells in vitro and in vivo using a Poly- β -amino ester coating to provoke endolysosome bursting.¹⁰⁵ The work carried out by Shen et al demonstrated that MSPs coated with PEI cannot only carry a siRNA but also deliver it to xenografted tumors, reducing the size of the tumoural mass.¹⁰⁶

Destabilization of the endosomal membrane

Other mechanisms to trigger particle endo-lysosomal escape are fusion lipids, cationic polymers, peptides¹⁰⁷ or carbon nanotubes.¹⁰³ In the study performed by Zhang et al, they synthesized polymer-lipid supported mesoporous silica nanoparticles (PLS-MSPs).¹⁰⁸ These nanocarriers were able to release the anticancer drug (CPT -11) and maximize the effect of the treatment in MDR breast cancer cells. Apart from fusion lipids, many cell-penetrating peptides (fusogenic peptides) are being used based on bacterial or viral proteins. These peptides trigger vacuole-based endocytosis and/or to create discontinuities or pores on the cell membrane.^{109,110} For instance, Li and colleagues used MSPs coated with PEI and a fusogenic peptide to deliver siRNA to a tumor model showing an inhibition of the tumoral cell proliferation.¹¹¹ Likewise, in some of our studies, we show how silica nanoparticles, when coated with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), can escape the endo-lysosomal route

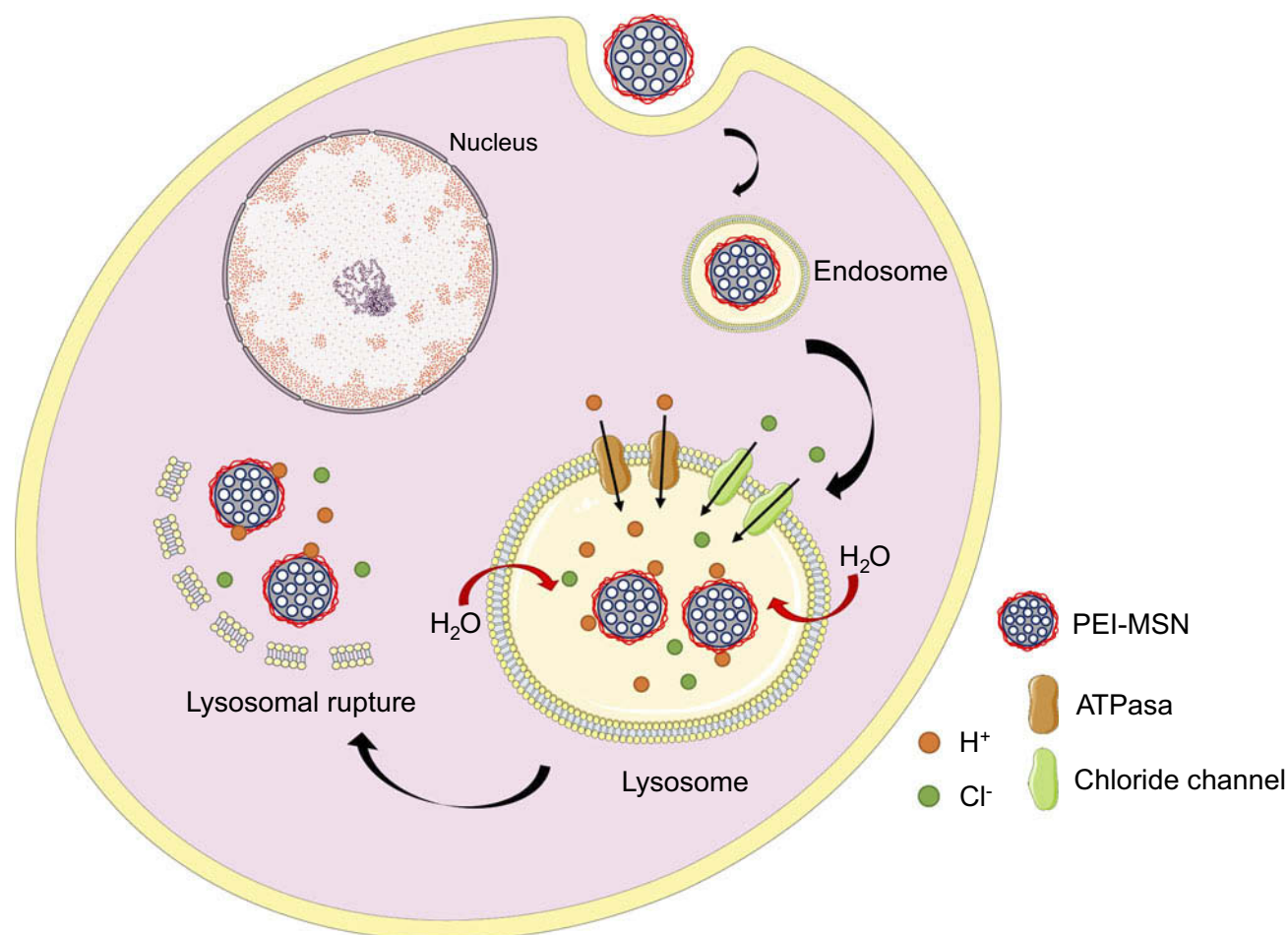


Figure 6 Diagram of the proton sponge effect: particles coated with polyethyleneimine (PEI) are captured in the endolysosomal route. Lysosomal membranes tear apart, releasing the particles in the cytosol.

AQ8

mimicking the viral spike fusion in lysosomes. The hypothesis is that proteins functionalizing the MWCNT surface are degraded in endolysosomes, exposing the surface of the nanotubes that are highly reactive and apolar. These stripped filaments now interact with the membrane of the endo-lysosomal vesicles, piercing and tearing it apart, triggering particle release into the cytoplasm (Figure 7).¹⁰³

Biocompatibility

Last, but not least, one of the most important features of MSPs is their biocompatibility. Different studies have demonstrated that silica nanoparticles are not toxic when administrated to different cell types at different dosages.^{99,112–114} Furthermore, there are several reports demonstrating that MSPs are degradable in water and in phosphate buffer saline.^{13,14} There are different parameters that can trigger MSPs in vitro degradation including i)

particle morphology,¹¹⁵ ii) surface area¹¹⁶ and iii) surface functionalization^{117,118} among others. For instance, spherical particles are more degradable than with rod-shaped particles.¹¹⁵ Similarly, particles that have a high surface area are more degradable.¹¹⁶ Interestingly, the MSPs size is apparently not all that important in degradation in water or simulated body fluids.^{119,120} Moreover, MSP and their fragments have also been reported to be eliminated by renal clearance, in urine, and/or feces.^{113,121,123} Interestingly, positively charged MSPs are cleared faster than particles with a negative ζ potential. Also, PEGylated MSPs show a higher in vivo circulation time, since PEG avoids macrophage recognition and phagocytosis in the liver and spleen. Other studies are now developing to improve the interactions of nanomaterials with blood components. For instance, Rogers et al have demonstrated that the functionalization of MSPs with different lipids can be used to imitate red blood cell lipid membranes, improving their hemo-biocompatibility.¹²¹

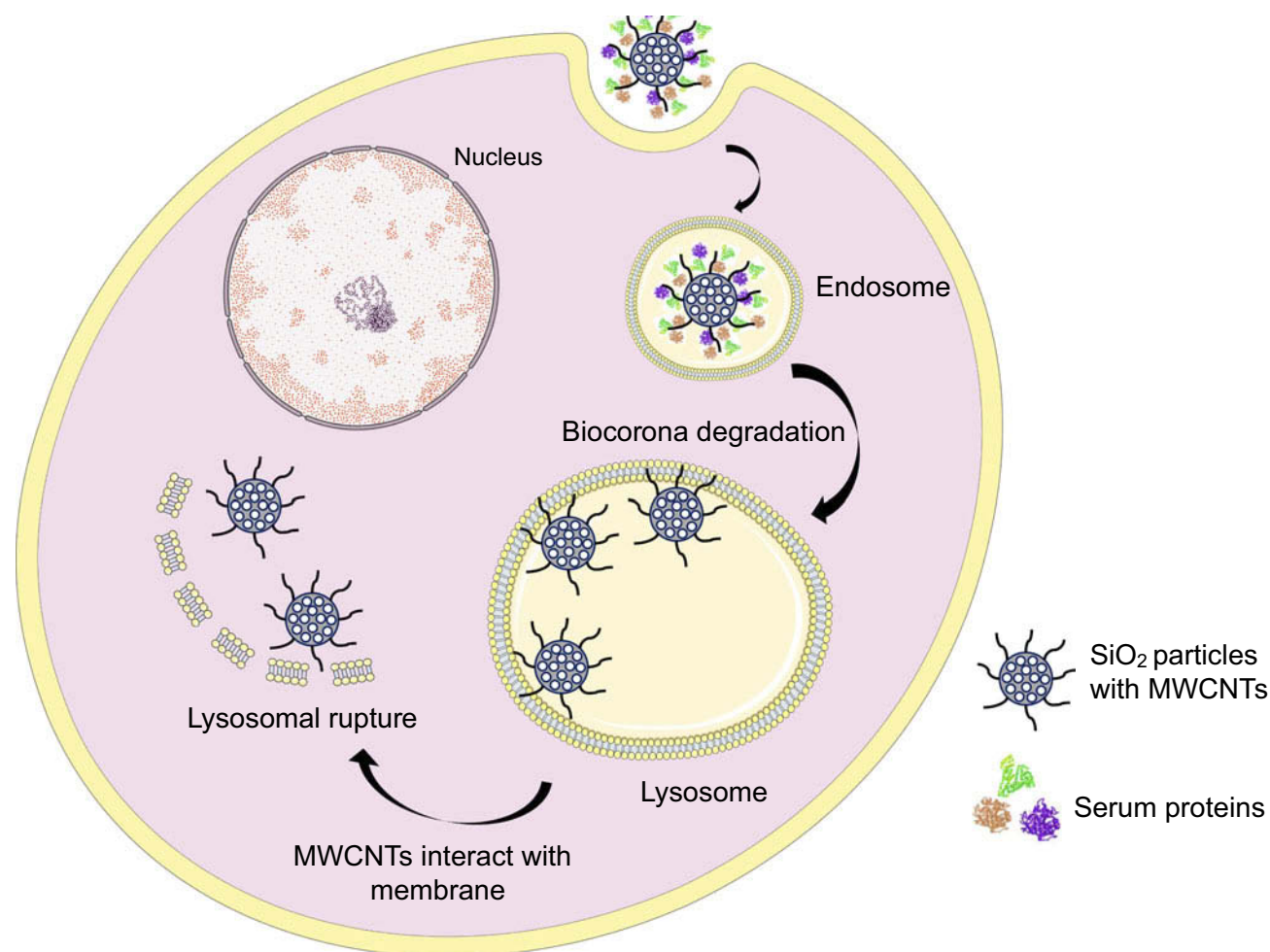


Figure 7 Diagram of how mesoporous SiO₂ particles with a multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) coating, escape the endolysosomal route. When proteins of the biocorona are degraded, apolar MWCNTs interact with the membrane and help particles escape these vesicles.

Drawbacks of MSPs

Ideally, nanoparticles need i) to be stable, ii) to have a high loading capacity, iii) to be reproducible and iv) scalable in production. Reproducible MSPs synthesis is reasonably feasible when working at small scale, but the scaling up is not trivial therefore, reproducibility at industrial scale must be critically considered. Regarding the loading capacity of MSPs, not all drugs can be incorporated at an adequate concentration, and this critically influences the total concentration of nanoparticles that should be administrated to obtain an effective therapeutic effect. For instance, the tolerated dose of uncoated MSPs in murine models is ca. 50 mg/kg, but the human tolerance is so far unknown and needs to be evaluated.¹²³ Also, most biodistribution and excretion studies have been performed in mice¹²⁴ and must be reproduced in humans to understand the immune response and possible side-effects of these nanomaterials.

Another important point regarding the use of MSPs in clinical trials is the fact that the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency must evaluate drug delivery nanocarriers before bench-to-bed translation, even if loaded with drugs already approved for clinical use. This is a slow procedure that significantly delays all new developments in nanodelivery. Hopefully, soon new requirements will be developed to accelerate the translation from research to the clinic.

Conclusion

The field of nanotechnology is gaining a high interest in cancer medicine. MSPs can be customized on demand in order to engineer nanocarriers that can i) target cells specifically, ii) release drugs inside the desired tissues/cells reducing the side effects of the treatment, iii) invade the cytoplasm by scaping the endo-lysosomal membrane, so that the cargo is preserved and finally iv) be biodegraded or cleared from the organism to minimize toxicity. Although MSPs are being widely studied as nanocarrier systems in animal models to ensure they are safe, more research is needed in the field of nanodelivery in cancer.

Acknowledgments

This work has been supported by the Spanish MINECO and European Union FEDER Funds under Project Ref. PI16/00496 (AES 2016), CTM 2017-84050-R, MAT 2015-69508-P, NanoBioApp Network (MINECO-17-MAT2016-81955-REDT), Xunta de Galicia (Centro Singular de Investigación de Galicia - Accreditation 2016-2019 and

EM2014/035), European Union (European Regional Development Fund-ERDF) and IDIVAL INNVAL15/15 and INNVAL17/11.

Images have been produced using the free software available at <https://smart.servier.com/>.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Cho K, Wang X, Nie S, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1310–1316. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
2. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*. 2007;2:751–760. doi:10.1038/nnano.2007.387
3. Mo R, Jiang T, Gu Z. Enhanced anticancer efficacy by ATP-mediated liposomal drug delivery. *Angew Int Ed Chemie*. 2014;53:1–7. doi:10.1002/anie.201400268
4. Dicheva BM, Ten Hagen TLM, Seynhaeve ALB, Amin M, Eggermont AMM, Koning GA. Enhanced specificity and drug delivery in tumors by cRGD - anchoring thermosensitive liposomes. *Pharm Res*. 2015;32(12):3862. doi:10.1007/s11095-014-1538-5
5. Talelli M, Barz M, Rijcken CJF, Kiessling F, Hennink WE, Lammers T. Core-crosslinked polymeric micelles: principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today*. 2015;10(1):93–117. doi:10.1016/j.nantod.2015.01.005
6. Jhaveri AM, Vladimir P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol*. 2014;5:1–26. doi:10.3389/fphar.2014.00001
7. Wu H, Shi H, Zhang H, et al. Biomaterials Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery. *Biomaterials*. 2014;35:5369–5380. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.038
8. Tang MX, Redemann CT, Szoka FC. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem*. 1996;7(6):703–714. doi:10.1021/bc9600630
9. Zhang C, Pan D, Luo K, She W, Guo C, Yang Y. Peptide dendrimer – doxorubicin conjugate-based nanoparticle as an enzyme-responsive drug delivery system for cancer therapy. *Adv Health Mater*. 2014;3(8):1299–1308.
10. Yavuz B, Pehlivan SB, Imran Vural NÜ. In vitro/In vivo evaluation of dexamethasone-PAMAM dendrimer complexes for retinal drug delivery. *Pharm Drug Deliv Pharm Technol*. 2015;104:3814–3823.
11. Maleki Dizaj S, Barzegar-Jalali M, Hossein Zarrintan M, Adibkia K, Lotfipour F. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(10):1649–1660. doi:10.1517/17425247.2015.1049530
12. Zhou J, Zhang W, Hong C, Pan C. Silica nanotubes decorated by pH-responsive diblock copolymers for controlled drug release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(6):3618–3625. doi:10.1021/am507832n
13. Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I, Manzano M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: current insights. *Molecules*. 2018;23(1):47. doi:10.3390/molecules23010047
14. Poonia N, Lather V, Pandita D. Mesoporous silica nanoparticles: a smart nanosystem for management of breast cancer. *Drug Discov Today*. 2017;23(2):315–332. doi:10.1016/j.drudis.2017.10.022
15. Petrak K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Discov Today*. 2005;10(23):1667–1673. doi:10.1016/S1359-6446(05)03698-6

16. Vogt C, Toprak MS, Muhammed M, Laurent S, Jean-Luc Bridot RNM. High quality and tuneable silica shell-magnetic core nanoparticles. *J Nanopart Res.* 2010;12(4):1137–1147. doi:10.1007/s11051-009-9661-7
17. Slowing II, Trewyn BG, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *Jacs.* 2007;129:8845–8849. doi:10.1021/ja0719780
18. Bharti C, Nagaich U, Pal AK, Gulati N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: a review. *Int J Pharm Investig.* 2015;5(3):124–133. doi:10.4103/2230-973X.160844
19. Khosravian P, Ardestani MS, Khoobi M, et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Onco Targets Ther.* 2016;9:7315–7330. doi:10.2147/OTT.S113815
20. Meng H, Wang M, Liu H, et al. Use of a lipid-coated mesoporous silica nanoparticle platform for synergistic gemcitabine and paclitaxel delivery to human pancreatic cancer in mice. *ACS Nano.* 2015;9(4):3540–3557. doi:10.1021/acsnano.5b00510
21. Rosenholm JM, Sahlgrén C, Lindén M. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr Drugs Targets.* 2011;12:1166–1186. doi:10.2174/138945011795906624
22. Napierska D, Thomassen LCJ, Rabolli V, et al. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small.* 2009;5(7):846–853. doi:10.1002/sml.200800461
23. Lu F, Wu S, Hung Y, Mou C. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small.* 2009;5(12):1408–1413. doi:10.1002/sml.v5:12
24. Oh W, Kim S, Choi M, et al. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano.* 2010;4(9):5301–5313. doi:10.1021/nn100561e
25. Bhattacharjee S, Lhj DH, Evers NM, et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7(25):1–12. doi:10.1186/1743-8977-7-1
26. Dávila-Ibáñez AB, Salgueirino V, Martínez-Zorzano V, et al. Magnetic silica nanoparticle cellular uptake and cytotoxicity regulated by electrostatic polyelectrolytes-DNA loading at their surface. *ACS Nano.* 2012;1:747–759. doi:10.1021/nn204231g
27. Dávila-Ibáñez AB, Buurma NJ, Salgueirino V. Assessment of DNA complexation onto polyelectrolyte-coated magnetic silica nanoparticles. *Nanoscale.* 2013;5:4797–4807. doi:10.1039/c3nr34358h
28. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM, Le L. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 2002;200:581–597.
29. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(11):653–664. doi:10.1038/nrclinonc.2010.139
30. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:2–25. doi:10.1016/j.addr.2013.11.009
31. Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Ulbrich K, Akaike T. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89:307–314.
32. Lee JE, Lee N, Kim H, et al. Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *Jacs.* 2010;132:552–557. doi:10.1021/ja905793q
33. Meng H, Mai WX, Zhang H, et al. Codelivery of an optimal Drug/siRNA combination using mesoporous silica nanoparticles to overcome drug resistance in breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *ACS Nano.* 2013;7(2):994–1005. doi:10.1021/nn3044066
34. Durfee PN, Lin Y, Dunphy DR, et al. Mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers (Protocells) for active targeting and delivery to individual leukemia cells. *ACS Nano.* 2016;10(9):8325–8345. doi:10.1021/acsnano.6b02819
35. Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, et al. Synthesis of theranostic epithelial cell adhesion molecule targeted mesoporous silica nanoparticle with gold gatekeeper for hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine.* 2017;12(11):1261–1279. doi:10.2217/nnm-2017-0028
36. Zhou S, Wu D, Yin X, et al. Intracellular pH-responsive and rituximab-conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to lymphoma B cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(24):1–14. doi:10.1186/s13046-016-0473-1
37. Li M, Zhang W, Wang B, Gao Y, Song Z, Zheng QC. Ligand-based targeted therapy: a novel strategy for hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine.* 2016;1:5645–5669. doi:10.2147/IJN.S115727
38. Wang K, Yao H, Meng Y, Wang Y, Yan X, Huang R. Specific aptamer-conjugated mesoporous silica-carbon nanoparticles for HER2-targeted chemo-photothermal combined therapy. *Acta Biomater.* 2015;16:196–205. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.002
39. Mo J, He L, Ma B, Chen T. Tailoring particle size of mesoporous silica nanosystem to antagonize glioblastoma and overcome blood-brain barrier. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(11):6811–6825. doi:10.1021/acsnano.5b11730
40. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:1278–1288. doi:10.1016/j.addr.2008.03.012
41. Warburg O, Franz Wind AEN. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1926;8:519–530. doi:10.1085/jgp.8.6.519
42. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309–314.
43. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science (80-).* 1997;277:1232–1237. doi:10.1126/science.277.5330.1232
44. Sukhorukov GB, Donath E, Lichtenfeld H, et al. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surf A.* 1998;137:253–266. doi:10.1016/S0927-7757(98)00213-1
45. Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA, Möhwald H. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Int Ed Chemie.* 1998;37(16):2201–2205. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980904)37:16<2201::AID-ANIE2201>3.0.CO;2-E
46. Feng W, Nie W, He C, et al. Effect of pH-responsive alginate/chitosan multilayers coating on delivery efficiency, cellular uptake and biodistribution of mesoporous silica nanoparticles based nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(11):8447–8460. doi:10.1021/am501337s
47. Xu R, Sun G, Li Q, Wang E, Gu J. A dual-responsive superparamagnetic Fe₃O₄/Silica/PAH/PSS material used for controlled release of chemotherapeutic agent, keggin polyoxotungstate, PM -19. *Solid State Sci.* 2010;12(10):1720–1725. doi:10.1016/j.solidstatescienc.2010.06.026
48. Feng W, Zhou X, He C, et al. Polyelectrolyte multilayer functionalized mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery: layer thickness-dependent release profiles and biocompatibility. *J Mater Chem B.* 2013;1:5886–5898. doi:10.1039/c3tb21193b
49. Wan X, Zhang G, Liu S. pH-disintegrable polyelectrolyte multilayer-coated mesoporous silica nanoparticles exhibiting triggered co-release of cisplatin and model drug molecules. *Macromol Rapid Commun.* 2011;32(14):1082–1089. doi:10.1002/marc.201100198

50. Chen T, Hao Y, Yang N, Wang M, Dinga C, Fu J. Graphene quantum dot-capped mesoporous silica nanoparticles through an acid-cleavable acetal bond for intracellular drug delivery and imaging. *Mater Chem B*. 2014;2:4979–4982. doi:10.1039/C4TB00849A
51. Chen Y, Ai K, Liu J, Sun G, Yin Q, Lu L. Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2015;60:111–120. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.003
52. Martínez-Carmona M, Lozano D, Vallet-Regí M. Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomater*. 2018;65:393–404. doi:10.1016/j.actbio.2017.11.007
53. Chem JM, Cheng S, Liao W, Chen L, Lee C. pH-controllable release using functionalized mesoporous silica nanoparticles as an oral drug delivery system. *J Mater Chem*. 2011;21:7130–7137. doi:10.1039/c0jm04490c
54. Huang I, Sun S, Cheng S, Lee C, Wu C. Enhanced chemotherapy of cancer using pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles to antagonize P-glycoprotein-mediated drug resistance. *Ther Discov*. 2011;10(5):761–769.
55. Lin C, Cheng S, Liao W, et al. Mesoporous silica nanoparticles for the improved anticancer efficacy of cis-platin. *Int J Pharm*. 2012;429:138–147. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.03.026
56. Lin J, Du J, Yang Y, Li L, Zhang D. pH and redox dual stimulate-responsive nanocarriers based on hyaluronic acid coated mesoporous silica for targeted drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;81:478–484. doi:10.1016/j.msec.2017.08.036
57. Zhang M, Jia L, Ying K, et al. Ingenious pH-sensitive dextran/mesoporous silica nanoparticles based drug delivery systems for controlled intracellular drug release. *Int J Biol Macromol*. 2017;98:691–700. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.136
58. Sun L, Zhang X, An J, Su C, Guo Q, Li C. Boronate ester bond-based core-shell nanocarriers with pH response for anticancer drug delivery. *RSC Adv*. 2014;4:20208–20215. doi:10.1039/C4RA01812E
59. Tan L, Yang M, Wu H, et al. Glucose- and pH-responsive nanogated ensemble based on polymeric network capped mesoporous silica. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:6310–6316. doi:10.1021/acsami.5b00631
60. Li Z, Liu Y, Wang X, et al. One-pot construction of functional mesoporous silica nanoparticles for the tumor-acidity-activated synergistic chemotherapy of glioblastoma. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5:7995–8001. doi:10.1021/am401486h
61. Lee C, Cheng S, Huang I, et al. Intracellular pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for the controlled release of anticancer chemotherapeutics. *Angew Int Ed Chemie*. 2010;49:8214–8219. doi:10.1002/anie.201002639
62. Cheng Y, Luo G, Zhu J, et al. Enzyme-induced and tumor-targeted drug delivery system based on multifunctional mesoporous silica nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:9078–9087. doi:10.1021/acsami.5b00752
63. De la Rica R, Aili D, Stevens MM. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(11):967–978. doi:10.1016/j.addr.2012.01.002
64. Liu Y, Ding X, Li J, et al. Enzyme responsive drug delivery system based on mesoporous silica nanoparticles for tumor therapy *in vivo*. *Nanotechnology*. 2015;26(14):145102. doi:10.1088/0957-4484/26/14/145102
65. Saito G, Swanson JA, Lee K. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:199–215.
66. Chen X, Sun H, Hu J, Han X, Liu H, Hu Y. Biointerfaces Transferrin gated mesoporous silica nanoparticles for redox-responsive and targeted drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;152:77–84. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.01.010
67. Mortera R, Vivero-Escoto J, Slowing II, Garrone E, Onida B, Lin VS. Cell-induced intracellular controlled release of membrane impermeable cysteine from a mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system. *Chem Commun*. 2009;(22):3219–3221. doi:10.1039/b900559e
68. Ma X, Nguyen KT, Borah P, Ang CY, Zhao Y. Functional silica nanoparticles for redox-triggered Drug/ssDNA co-delivery. *Adv Healthc Mater*. 2012;1(6):690–697. doi:10.1002/adhm.201200123
69. Nadrah P, Porta F, Planinsek O, Krosb A, Gabersek M. Poly(propylene imine) dendrimer caps on mesoporous silica nanoparticles for redox-responsive release: smaller is better. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15:10740–10748. doi:10.1039/c3cp44614j
70. Zhang J, Niemelä M, Westermarck J, Rosenholm JM. Mesoporous silica nanoparticles with redox-responsive surface linkers for charge-reversible loading and release of short oligonucleotide. *Dalt Trans*. 2014;43:4115–4126. doi:10.1039/c3dt53071j
71. Torney F, Trewyn BG, Lin VS-Y, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotechnol*. 2007;2:295–300. doi:10.1038/nnano.2007.108
72. Giri S, Trewyn BG, Stellmaker MP, Lin VS-Y. Stimuli-Responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles. *Angew Chem*. 2005;117:5166–5172. doi:10.1002/ange.200501819
73. Yi Z, Hussain HI, Feng C, et al. Functionalized mesoporous silica nanoparticles with redox-responsive short-chain gatekeepers for agrochemical delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(18):9937–9946. doi:10.1021/acsami.5b02131
74. Gong H, Xie Z, Liu M, Zhu H, Sun H. Redox-sensitive mesoporous silica nanoparticles functionalized with PEG through a disulfide bond linker for potential anticancer drug delivery. *RSC Adv*. 2015;5:59576–59582. doi:10.1039/C5RA09774F
75. Palanikumar L, Choi ES, Cheon JY, Joo SH, Ryu J-H. Noncovalent polymer-gatekeeper in mesoporous silica nanoparticles as a targeted drug delivery platform. *Adv Funct Mater*. 2014;25(6):957–965. doi:10.1002/adfm.201402755
76. Gimenez C, De La Torre C, Gorbé M, et al. Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells. *Langmuir*. 2015;31(12):3753–3762. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00139
77. Liu R, Zhao X, Wu T, Feng P. Tunable redox-responsive hybrid nanogated ensembles. *Jacs*. 2008;130:14418–14419. doi:10.1021/ja8060886
78. Watermann A, Brieger J. Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery vehicles in cancer. *Nanomaterials*. 2017;7(7):189. doi:10.3390/nano7120458
79. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Publ Gr*. 2013;12(11):991–1003.
80. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011;166(1–2):8–23. doi:10.1016/j.cis.2011.04.003
81. Torres-Lugo M, Rinaldi C. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2013;8(10):1689–1707. doi:10.2217/nmm.13.146
82. Guisasaola E, Baeza A, Talelli M, et al. Magnetic-responsive release controlled by hot spot effect. *Langmuir*. 2015;31(46):12777–12782. doi:10.1021/acs.langmuir.5b03470
83. Baeza A, Guisasaola E, Ruiz-Herna E, Vallet-Regí M. Magnetically triggered multidrug release by hybrid mesoporous silica nanoparticles. *Chem Mater*. 2012;24:517–524. doi:10.1021/cm203000u
84. Thomas CR, Ferris DP, Lee J, et al. Noninvasive remote-controlled release of drug molecules *in vitro* using magnetic actuation of mechanized nanoparticles. *Jacs*. 2010;132:10623–10625. doi:10.1021/ja1022267

85. Ferris DP, Zhao Y, Khashab NM, Khatib HA, Stoddart JF, Zink JJ. Light-operated mechanized nanoparticles. *Jacs*. 2009;131:1686–1688.
86. Wu S, Butt H-J. Near-infrared-sensitive materials based on upconverting nanoparticles. *Adv Mater*. 2016;28:1208–1226.
87. Inoue Y, Kuad P, Okumura Y, Takashima Y, Yamaguchi H, Harada A. Thermal and photochemical switching of conformation of Poly(ethylene glycol)-substituted cyclodextrin with an azobenzene group at the chain end. *Jacs*. 2007;129:6396–6397.
88. Wang Z, Johns VK, Liao Y. Controlled release of fragrant molecules with visible light. *Chem Eur J*. 2014;20:1–5.
89. Mekaru JLH, Tamanoi F. Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;95:40–49.
90. Guardado-Álvarez TM, Devi LS, Russell MM, Schwartz BJ, Zink JJ. Activation of snap-top capped mesoporous silica nanocontainers using two near-infrared photons. *Jacs*. 2013;135(38):14000–14003.
91. Martínez-Carmona M, Lozano D, Baeza A, Colilla M, Vallet-Regí M. A novel visible light responsive nanosystem for cancer treatment. *Nanoscale*. 2017;9(41):15967–15973.
92. Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;62(11):1064–1079.
93. Tong L, Wei Q, Wei A, Cheng J. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects. *Photochem Photobiol*. 2009;85:21–32.
94. Ke H, Wang J, Dai Z, et al. Gold-nanoshelled microcapsules: a theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy. *Angew Int Ed Chemie*. 2011;50:3017–3021.
95. Wang X, Tan -L-L, Li X, et al. Smart mesoporous silica nanoparticles gated by pillararene-modified gold nanoparticles for on-demand cargo release. *Chem Commun*. 2016;52:13775–13778.
96. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Wu C-W, Lin VS-Y. Photoinduced intracellular controlled release drug delivery in human cells by gold-capped mesoporous silica nanosphere. *Jacs*. 2009;131:3462–3463.
97. Suit HD, Gerweck LE. Potential for hyperthermia and radiation therapy. *Cancer Res*. 1979;39:2290–2298.
98. Deswal K, Chohan IS. Effects of hyperthermia on enzymes and electrolytes in blood and cerebrospinal fluid in dogs. *Int J Biometeor*. 1981;25(3):227–233.
99. González-Domínguez E, Iturrioz-Rodríguez N, Padín-González E, et al. Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible. *Int J Nanomed*. 2017;12:6317–6328.
100. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:51–63. doi:10.2147/IJN.S26592
101. Hu L, Mao Z, Zhang Y, Gao C. Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells. *J Nanosci Lett*. 2011;1(1):1–16.
102. Freeman EC, Weiland LM, Meng WS. Modeling the proton sponge hypothesis: examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;24(4):398–416. doi:10.1080/09205063.2012.690282
103. Iturrioz-Rodríguez N, González-Lavado E, Marín- L, Araújo BV, Pérez-Lorenzo M, Fanarraga ML. A biomimetic escape strategy for cytoplasm invasion by synthetic particles. *Angew Int Ed Chemie*. 2017;56(44):13736–13740. doi:10.1002/anie.201707769
104. Nelson N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12:71–75.
105. Wu M, Meng Q, Chen Y, et al. Large pore-sized hollow mesoporous organosilica for redox-responsive gene delivery and synergistic cancer chemotherapy. *Adv Mater*. 2016;28:1963–1969. doi:10.1002/adma.201505524
106. Shen J, Kim H, Su H, et al. Cyclodextrin and polyethylenimine functionalized mesoporous silica nanoparticles for delivery of siRNA cancer therapeutics. *Theranostics*. 2014;4:487–497. doi:10.7150/thno.8263
107. Ma D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale*. 2014;6:6415–6425. doi:10.1039/c4nr00018h
108. Zhang X, Li F, Guo S, et al. Biofunctionalized polymer-lipid supported mesoporous silica nanoparticles for release of chemotherapeutics in multidrug resistant cancer cells. *Biomaterials*. 2014;35(11):3650–3665. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.013
109. Crombez L, Charnet A, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Heitz F, Divita G. A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:44–46. doi:10.1042/BST0350044
110. Nakase I, Akita H, Kogure K, et al. Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. *Acc Chem Res*. 2012;45(7):1132–1139. doi:10.1021/ar200256e
111. Li X, Chen Y, Wang M, Ma Y, Xia W, Gu H. A mesoporous silica nanoparticle e PEI e Fusogenic peptide system for siRNA delivery in cancer therapy. *Biomaterials*. 2013;34:1391–1401. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.072
112. Agostini A, Mondragón L, Bernardos A, et al. Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew Int Ed Chemie*. 2012;51:1–6. doi:10.1002/anie.201204663
113. Chen Y, Chen H, Shi J. *In vivo* bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Adv Mater*. 2013;25:1–33. doi:10.1002/adma.201205292
114. Shi Y, Hélayr C, Haye B, Coradin T. Extracellular versus Intracellular Degradation of Nanostructured Silica Particles. *Langmuir*. 2018;34:406–415. doi:10.1021/acs.langmuir.7b02231
115. Chen D, Hao N, Liu H, et al. *In vitro* degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions *in vitro* degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;12:6346–6354.
116. Huang X, Young NP, Townley HE. Characterization and comparison of mesoporous silica particles for optimized drug delivery. *Nanomater Nanotechnol*. 2014;4(2):1–15. doi:10.5772/58290
117. Paris JL, Cabañas MV, Manzano M, Vallet-Regí M. Polymer-grafted mesoporous silica nanoparticles as ultrasound-responsive drug carriers. *ACS Nano*. 2015;9(11):11023–11033. doi:10.1021/acsnano.5b04378
118. Cauda V, Argyo C, Bein T. Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J Mater Chem*. 2010;20:8693–8699. doi:10.1039/c0jm01390k
119. Yamada H, Urata C, Aoyama Y, Osada S, Yamauchi Y, Kuroda K. Preparation of colloidal mesoporous silica nanoparticles with different diameters and their unique degradation behavior in static aqueous systems. *Chem Mater*. 2012;24:1462–1471. doi:10.1021/cm3001688
120. Braun K, Pochert A, Beck M, Fiedler R. Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2016;79(2):319–327. doi:10.1007/s10971-016-4053-9
121. Rogers RA, Joglekar M, Valenstein JS, Trewyn BG. Mimicking red blood cell lipid membrane to enhance the hemocompatibility of large-pore mesoporous silica. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(3):1675–1681. doi:10.1021/am4045713
122. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JJ, Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Tumor Suppr*. 2010;6(16):1794–1805.

910

123. Lu J, Li Z, Zink JJ, Tamanoi F. *In vivo* tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine NBM*. 2012;8(2):212–220. doi:10.1016/j.nano.2011.06.002

124. He Q, Zhang Z, Gao F, Li Y, Shi J. *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and pegylation. *Small*. 2011;7(2):271–280. doi:10.1002/sml.201001459

915

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>