

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nanopartículas
multifuncionales para el tratamiento y
diagnóstico de precisión de cáncer de
cabeza y cuello**

Realizada por:

Elena M^a Navarro Palomares

Dirigida por:

**Rafael Valiente Barroso
Juan Carlos Villegas Sordo**

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria
Santander 2019

D. Rafael Valiente Barroso, Profesor Titular del Dpto. de Física Aplicada, y
D. Juan Carlos Villegas Sordo, Catedrático del Dpto. de Anatomía y Biología
Celular, directores de la Tesis Doctoral de D^a. Elena M^a Navarro Palomares

INFORMAN:

Que el trabajo que se presenta en su Memoria, titulado *Desarrollo de nanopartículas multifuncionales para el tratamiento y diagnóstico de precisión de cáncer de cabeza y cuello*, ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Nanomedicina de la Universidad de Cantabria y el IDIVAL, dentro del programa de doctorado en Biología Molecular y Biomedicina, y que el contenido reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado para poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria. Por tanto, se emite la conformidad para esta memoria sea presentada y tenga lugar, posteriormente, la correspondiente Lectura y Defensa.

Santander, 29 de noviembre de 2019

Fdo.: Rafael Valiente Barroso

Fdo.: Juan Carlos Villegas Sordo

Esta tesis ha sido financiada gracias a:

- Proyecto PREVAL16/02, correspondiente con la ayuda recibida bajo la convocatoria del “Programa de Personal Investigador en Formación Predoctoral en el Área de la Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud (2015, BOC NÚM. 188)”. Proyectos INNVAL16/15, INNVAL17/11, INNVAL18/28, todos ellos del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL)
- Proyecto de investigación PI16/00496; Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Fondos FEDER.
- Proyectos MINECO. MAT2015-69508-P, MAT2016-81955-REDT y MAT2017-83631-C3-3-R.

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la contribución tanto científica como humana de muchas personas, a las que quiero dar las gracias en estas líneas.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi director, Rafael, por su cercanía, su gran dedicación, su disposición siempre que he necesitado algo, y por la paciencia que ha puesto en esta interacción bioquímica-física que ha dado tantos frutos. A mi co-director, Juan, gracias por toda la ayuda prestada, también más allá de la científica, al quitarme muchas piedras en el camino y permitir que haya podido llegar hasta aquí. También darle las gracias a Mónica, por su guía y ayuda, por transmitirme ese entusiasmo por la ciencia y el pensar más allá. Agradecer también al resto del grupo de Nanomedicina, por haberme ayudado en todo lo que he necesitado y por haber hecho tan enriquecedora esta experiencia.

A la que ha sido mi segunda familia durante estos cuatro años, mis compañeros de laboratorio y despacho: Esperanza, Eloísa, Nerea, Lourdes, Carlos, Lorena(s), Débora, Ana. Podría escribir otra tesis con todas las anécdotas y recuerdos que me llevo. Habéis hecho que, a pesar de todos los retos a los que nos hemos enfrentado cada día, con el apoyo mutuo al final todo fuese más llevadero. No podría haber tenido más suerte al encontraros en el camino. Mil gracias por tanto.

También agradecer a toda la gente de la Facultad de Ciencias y CITIMAC, por haberme acogido tan bien y haberme introducido en el mundo de la física, he aprendido mucho de vosotros. Gracias por toda la ayuda y el apoyo.

Gracias a toda la gente que he tenido el placer de conocer en mis dos estancias. Del INL, al grupo del Dr. Manuel Bañobre, por acogerme en su grupo y por su dedicación, que hizo posible sacar adelante todo el trabajo en tiempo récord. A todo el grupo de Bionanoplasmónica del CIC-biomaGUNE, en especial al Dr. Luis Liz-Marzán, por darme la oportunidad de trabajar en un grupo del que

aprender tanto, y a Ana Sánchez, por sus preciados consejos y por los buenos momentos en el laboratorio.

A IDIVAL, agradecer tanto la financiación durante estos años, como al personal de administración por su disposición e infinita paciencia, y a Fidel Madrazo por su gran apoyo en el Servicio de Microscopía.

Cómo no agradecer también a mis padres, Marisa y Pepe, y a mi hermana Anita el constante apoyo y cariño desde cientos de kilómetros de distancia. Gracias por haberme inculcado todos los valores que me han hecho llegar hasta aquí, por enseñarme que, con esfuerzo y dedicación, se pueden lograr todas las metas propuestas. Nunca estaré lo suficientemente agradecida.

A mi compañero de vida, Adri, por estar a mi lado cada día, por aguantarme en los malos momentos y sacarme fuerzas cuando flaqueaba, por hacerme creer en mí. Por quererme tan bien. Gracias por no fallarme y ser un pilar fundamental en todo este camino.

A todos vosotros, GRACIAS.

Índice

Resumen	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Cáncer de cabeza y cuello.....	13
1.1. Factores de riesgo.....	14
1.2. Diagnóstico.....	15
1.3. Tratamiento	17
2. Nanotecnología y nanomedicina.....	19
2.1. Nanomateriales.....	20
2.2. Nanomateriales de oro.....	23
2.3. Nanopartículas magnéticas.....	29
2.4. Hipertermia e importancia de la determinación de la temperatura... 35	
2.5. Modificaciones superficiales de los NMs para aplicaciones biomédicas	41
3. Dianas terapéuticas alternativas: receptor Gb3 y toxina Shiga.....	46
3.1. Alteración del metabolismo de glicoesfingolípidos en cáncer.....	46
3.2. Globotriosilceramida (Gb3) y su relevancia en cáncer	46
3.3. Ligandos de Gb3: toxinas Shiga	48
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Síntesis de nanomateriales	63
1.1. <i>Nanorods</i> de oro	63
1.2. Nanopartículas de óxido de hierro (Fe ₃ O ₄).....	66
1.3. Partículas de sílice	69
1.4. Recubrimiento de Y ₂ O ₃ :2%Er ³⁺	69
1.5. Caracterización de los nanomateriales	71
1.6. Soluciones empleadas en el estudio de la estabilidad del recubrimiento de SiO ₂ en medios fisiológicos	74
2. Proteínas recombinantes	75

2.1. Diseño de la construcción de la proteína fluorescente verde (6xHis:GFP)	75
2.2. Síntesis, clonación y transformación de STxB:6His	78
2.3. Sobreexpresión de 6xHis:GFP y STxB:6xHis.....	79
2.4. Lisis bacteriana y extracción de proteínas	80
2.5. Purificación de las proteínas recombinantes	81
2.6. Conjugación de STxB-6xHis con FITC	82
2.7. Electroforesis SDS-PAGE.....	82
2.8. Funcionalización de NMs con las proteínas recombinantes.....	84
2.9. Ensayos de la estabilidad de la funcionalización.....	86
3. Ensayos en cultivos celulares.....	89
3.1. Líneas celulares empleadas y condiciones de cultivo.....	89
3.2. Viabilidad celular	89
3.3. Inmunofluorescencia	90
3.4. Análisis de localización subcelular de las NPs mediante TEM.....	91
4. Hipertermia fotoinducida	92
4.1. Calentamiento de los nanomateriales en suspensión	92
4.2. Fotoactivación de las NPs en cultivos celulares.....	93
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
1. Síntesis y caracterización de los nanomateriales.....	97
1.1. Análisis mediante TEM de la morfología, recubrimiento y distribución de tamaños de los NMs sintetizados	97
1.2. Caracterización estructural por difracción de rayos X	101
1.3. Potencial ζ	102
1.4. Absorción UV-vis-NIR	104
1.5. Fluorescencia.....	106
1.6. Medidas magnéticas	108
1.7. Biocompatibilidad	111
1.8. Estabilidad del recubrimiento de SiO ₂ en medios fisiológicos.....	115
2. Biofuncionalización de NMs con proteínas recombinantes.....	120
2.1. Bioconjugación con 6xHis:GFP como prueba de concepto	120

2.2. Biofuncionalización con STxB:6xHis	127
3. Especificidad de los NMs biofuncionalizados con STxB:6xHis por el receptor Gb3	132
3.1. Análisis de la expresión del receptor Gb3 en células Detroit 562..	132
3.2. Análisis de la interacción de los NMs funcionalizados con el receptor Gb3	134
3.3. Análisis del mecanismo de entrada y la localización subcelular de los NMs funcionalizados con STxB	142
4. Terapia mediante hipertermia fotoinducida	148
4.1. Capacidad de calentamiento de los NMs sintetizados.....	148
4.2. Efecto de la hipertermia fotoinducida con NMs en células.....	154
5. Determinación de la temperatura de calentamiento: nanotermómetros basados en $Y_2O_3:2\%Er^{3+}$	156
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	157
PUBLICACIONES	157

Resumen

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común a nivel mundial, es de naturaleza generalmente localizado y su mortalidad por fallo loco-regional puede reducirse significativamente si se detecta precozmente. Por ello, surge la necesidad de explorar estrategias alternativas que puedan contribuir al diagnóstico temprano y al tratamiento local, contexto donde la nanotecnología puede aportar soluciones únicas. A lo largo de esta Tesis se desarrollan nanosistemas híbridos multifuncionales fotoactivables para su potencial aplicación en el diagnóstico de precisión y el tratamiento a demanda de esta patología. Se han sintetizado nanomateriales con un núcleo de oro y de óxido de hierro, capaces de calentarse al irradiarse con luz láser infrarroja, recubiertos de una capa de sílice fluorescente que sirve como plataforma para su funcionalización y además permite su detección aplicando luz visible. Para su direccionamiento, se han imitado los mecanismos de invasión celular utilizados por la toxina de la Shiga, cuyo receptor, el glucoesfingolípido Gb3, está sobreexpresado en el cáncer cabeza y cuello entre otros. Con este fin, se ha diseñado genéticamente y producido una proteína quimera recombinante conteniendo el dominio de interacción de la toxina fusionado a una secuencia de unión a nanomateriales. Este estudio demuestra el posicionamiento controlado, la estabilidad y eficiencia de este recubrimiento, y cómo los nanomateriales funcionalizados con esta proteína, se unen específicamente al receptor Gb3 en células tumorales de cabeza y cuello, invadiendo éstas siguiendo una ruta biomimética “no canónica”, vía aparato de Golgi y/o retículo endoplásmico, que permite evitar el paso por los lisosomas. Finalmente, esta tesis idea un recubrimiento a modo de nano-termómetro, y demuestra cómo la irradiación de células expuestas a estas nanopartículas con un láser de 808 nm provoca la muerte celular a demanda en escasos minutos.

ABREVIATURAS

5-BrSA	ácido 5-bromosalicílico
6xHis	Secuencia de 6 residuos de histidina
Abs	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
APTS	(3-aminopropil) trietoxisilano
ARN	ácido ribonucleico
AuNP(s)	nanopartícula(s) de oro
AuNR(s)	<i>nanorod</i> (s) de oro
CCC	cáncer de cabeza y cuello
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetil sulfóxido
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EPR	efecto de permeabilidad y retención aumentadas (del inglés <i>enhanced permeation and retention effect</i>)
FBS	suero fetal bovino (del inglés <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Gb3	globotriosilceramida
GFP	proteína fluorescente verde (del inglés <i>green fluorescent protein</i>)
HPV	virus del papiloma humano (del inglés <i>human papillomavirus</i>)
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
LEW	tampón de lisis-elución-lavado (del inglés <i>lysis-elution-wash</i>)
mPEG-SH	<i>O</i> -[2-(3-Mercaptopropionylamino)ethyl]- <i>O'</i> -methylpolyethylene glicol
MRI	imagen por resonancia magnética (<i>magnetic resonance imaging</i>)
NIR	infrarrojo cercano (del inglés <i>near infrared</i>)

Abreviaturas

NM(s)	nanomaterial(es)
NP(s)	nanopartícula(s)
PBS	tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	polietilenglicol
PET	tomografía de emisión de positrones
PF	paraformaldehído
PTFE	politetrafluoroetileno
RBITC	isotiocianato de rodamina B
RE	retículo endoplásmico
ROS	especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
SEM	microscopía electrónica de barrido
SPR	resonancia de plasmón de superficie (del inglés <i>surface plasmon resonance</i>)
STx	toxina Shiga
STxA	subunidad A de la toxina Shiga
STxB	subunidad B de la toxina Shiga
TEM	microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>transmission electron microscopy</i>)
TEOS	tetraetoxisilano
TRITC	5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate
UV-vis	ultravioleta-visible
XRD	difracción de rayos X

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) comprende un conjunto heterogéneo de tumores del tracto aerodigestivo superior. Más del 90% de los casos son carcinomas de células escamosas, por lo que generalmente se refiere a este tipo de tumores como carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

El CCC aparece en el tracto aerodigestivo superior, comprendiendo la cavidad nasal y los senos paranasales, cavidad oral, faringe, laringe y tráquea (Figura 1). Se trata del sexto cáncer en incidencia a nivel mundial y el octavo en mortalidad, con cerca de 600000 nuevos casos cada año y una baja tasa de supervivencia a largo plazo, en torno al 50% (Leemans *et al.*, 2018). En España se registran al año cerca de 11300 casos de tumores de cabeza y cuello y de todos ellos, el 40% se encuentran en la laringe (18 casos por cada 100000 habitantes), siendo uno de los países a nivel mundial con una mayor tasa de incidencia de este tipo de cáncer, debido al exceso en el consumo de tabaco registrado durante años (datos de la Asociación Española Contra el Cáncer).

El CCC comienza con lesiones precancerosas, no siempre visibles macroscópicamente, que tras una adquisición progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas conducen al desarrollo de un carcinoma y, en los casos más avanzados, la diseminación a los nódulos linfáticos yugulodigástricos y submandibulares, presentando el paciente masas en el cuello.

Las alteraciones se producen en genes que codifican proteínas implicadas en una gran variedad de cascadas de señalización que regulan procesos celulares clave, como son las vías de señalización de kinasas, ciclo celular y apoptosis, adhesión celular, motilidad e invasión, angiogénesis, inmortalización, quimiocinas e inflamación. Todas estas alteraciones son las que finalmente provocan los fenotipos asociados al cáncer. La vía más comúnmente alterada es la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este receptor se encuentra sobreexpresado en más del 90% de los casos de CCC (Pai & Westra, 2009), y numerosos estudios han relacionado esta sobreexpresión con

Introducción

un peor pronóstico en los pacientes. En cuanto al gen que codifica el EGFR, pueden darse mutaciones que provoquen que esté constitutivamente activada (presente en alrededor de un 40% de los pacientes), o amplificaciones del gen (10-30% de los casos) (Bernier *et al.*, 2009; Leemans *et al.*, 2018). Todas estas alteraciones provocan un aumento en la activación de las principales cascadas de señalización que participan en procesos de proliferación y supervivencia celular, promoviendo por tanto la oncogénesis y la progresión tumoral.

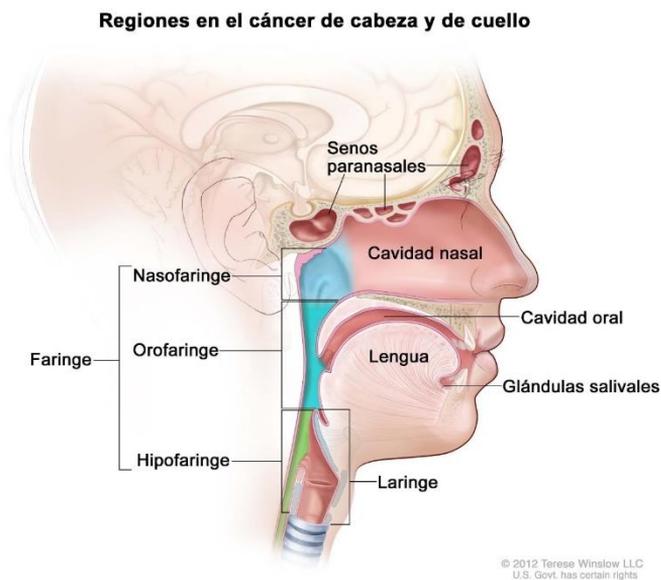


Figura 1. Regiones del tracto aerodigestivo superior que comprende el cáncer de cabeza y cuello. Imagen tomada de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello>.

1.1. Factores de riesgo

La exposición a carcinógenos, la dieta, la higiene oral, los agentes infecciosos y las condiciones médicas preexistentes juegan un papel, ya sea individualmente o de manera combinada, en el desarrollo de CCC. De todas ellas, el tabaco es el factor de riesgo dominante. Este riesgo se atribuye a los efectos genotóxicos de los carcinógenos presentes en el tabaco, como las

nitrosaminas y los hidrocarburos policíclicos, que son capaces de producir mutaciones en genes implicados en oncogénesis como *p53*. El consumo de alcohol es otro de los grandes factores de riesgo para el desarrollo de CCC, especialmente de casos de tumores en la hipofaringe. El metabolito del alcohol, el acetaldehído, es capaz de interferir en la síntesis y reparación del ADN. Sin embargo, el efecto más nocivo del alcohol radica en su capacidad de aumentar de manera sinérgica los efectos de fumar, ya que es capaz de aumentar y prolongar la exposición de la mucosa a los carcinógenos presentes en el tabaco (Pai & Westra, 2009).

El tabaco y el alcohol son responsables del desarrollo de la gran mayoría de tumores en la cavidad oral, la laringe y la hipofaringe, pero en el caso de los tumores de orofaringe, la infección por el virus del papiloma humano (HPV) es el principal causante (hasta en el 70% de los casos), especialmente en el mundo occidental. Son transmitidos vía sexual y, en los pacientes que no logran combatir la infección, el ADN del virus se integra en el del huésped, momento en el que las oncoproteínas del virus alterarán diferentes vías reguladoras que desencadenarán el desarrollo de tumores. La principal característica de los tumores HPV positivos es su mejor pronóstico respecto a los HPV negativos, por lo que actualmente se utiliza la categorización de los tumores de orofaringe en función de su estado de HPV para poder realizar tratamientos más especializados (Bose *et al.*, 2013; Leemans *et al.*, 2018; Marur & Forastiere, 2016).

1.2. Diagnóstico

Un diagnóstico preciso y estandarizado del cáncer es extremadamente importante para poder planificar las terapias más adecuadas para cada caso, teniendo en cuenta los resultados en casos previos con un pronóstico similar. El sistema de clasificación TNM (T de tumor, N de nódulos y M de metástasis) es el más utilizado para clasificar los tumores de CCC. Este sistema, como las

Introducción

propias siglas indican, tiene en cuenta el grado del tumor local, si éste se ha diseminado a ganglios linfáticos o ha generado metástasis en otros órganos. Así, se clasifican los tumores desde un estadio I a un estadio IV (Zhao *et al.*, 2017).

Tras la detección de una lesión precancerosa, lo que se hace en clínica es tratar estas lesiones, siempre que sea posible, y analizar el tejido con una biopsia para determinar la presencia de displasia, ya sea leve, moderada o severa. Para evitar biopsias invasivas, también se toman muestras de exfoliados o saliva para analizar biomarcadores de riesgo para el desarrollo de cáncer.

Las biopsias, junto con técnicas de imagen como las nasofaringolaringoscopias, la tomografía computerizada (CT) y la imagen por resonancia magnética son las técnicas utilizadas de rutina para determinar el alcance de la enfermedad y su estadio. La tomografía por emisión de positrones (PET) con ^{18}F -fluorodeoxiglucosa ha incrementado la sensibilidad en la detección de tumores primarios de pequeño tamaño, así como de extensión a los ganglios, que no son palpables ni visibles en la examinación clínica. De este modo, se ha mejorado la precisión en la determinación del estadio de la enfermedad, y como consecuencia en la planificación de tratamientos más adecuados para cada caso, sobre todo en los más avanzados. También se ha evidenciado la utilidad de la técnica PET-CT (combinación de tomografía por emisión de positrones con tomografía computerizada) en la evaluación post-tratamiento de los pacientes una vez han recibido quimiorradioterapia (Marur & Forastiere, 2016). Pese a todos los avances en estas técnicas, siguen urgiendo mejoras y alternativas que permitan un diagnóstico más temprano y preciso, ya que va a repercutir de manera crítica en las tasas de supervivencia de los pacientes.

1.3. Tratamiento

La cirugía, la radiación y la quimioterapia en diferentes combinaciones constituyen el tratamiento estándar para CCC, dependiendo del estadio TNM y el lugar de origen del tumor. Los tumores de estadios tempranos son los diagnosticados en alrededor de un 40% de los pacientes y son tratados con cirugía o solo con radioterapia. En casos más avanzados, también se emplea quimioradioterapia basada en platino, con o sin quimioterapia como tratamiento secuencial. En el caso de las metástasis, son tratadas con quimioterapia con un solo fármaco o con una combinación de ellos, en función de la respuesta del paciente. El tratamiento de recurrencias va a depender del lugar de la misma, del volumen del tumor y de las terapias previamente recibidas, y puede variar en diferentes combinaciones de las tres modalidades de tratamiento estándar (Marur & Forastiere, 2016). Todos estos tratamientos están asociados con una toxicidad que van a afectar a la función de los órganos del paciente, disminuyendo notablemente su calidad de vida.

El objetivo de la resección quirúrgica es realizar una extirpación completa y definitiva del tumor, así como proporcionar información para ayudar al estadiaje y a la administración de la terapia adyuvante más adecuada. No obstante, en muchas ocasiones tiene que haber un balance entre la zona a extirpar y la preservación de las funciones de los órganos implicados. Los métodos de cirugía clásicos suelen resultar en deformaciones funcionales y estéticas que afectan a la calidad de vida del paciente; es por ello que han surgido innovaciones como la cirugía láser o la cirugía robótica transoral, que proporcionan una mejorada visión del tumor y el tejido circundante, permitiendo manipular secciones más pequeñas de manera precisa, dando menos complicaciones post-operatorias a los pacientes y una recuperación más rápida (Leemans *et al.*, 2018; Marur & Forastiere, 2016).

No obstante, la delimitación de los límites quirúrgicos sigue suponiendo uno de los mayores retos en el CCC. En estos márgenes quirúrgicos se encuentran

Introducción

alteraciones genéticas compartidas con las del tumor, ya que tienen un origen clonal común al haber estado expuestas a los mismos carcinógenos. Es por ello que el desarrollo de recurrencias es tan frecuente en CCC. La mayoría de los estudios establecen en 5 mm el margen de seguridad para la eliminación del tumor. Sin embargo, esta cifra no siempre va a ser la adecuada para todos los casos, pues van a entrar en juego una gran diversidad de factores como son el tamaño, el estadio y el grado de invasión del tumor, su localización, si se ha recibido algún tratamiento previo, etc. Por otra parte, también va a influir la técnica quirúrgica utilizada por el cirujano, así como las técnicas histopatológicas que se utilicen para la evaluación de los márgenes quirúrgicos, que suelen ser insuficientes, además de no estar estandarizadas (Baddour *et al.*, 2016; Williams, 2016).

1.3.1. Terapias moleculares

Ante la escasa mejora de las tasas de CCC en los últimos años, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de terapias moleculares dirigidas de manera específica para la biología del CCC. La vía de EGFR ha sido la más explotada al aparecer alterada en la mayoría de los casos avanzados. De hecho, la única terapia dirigida aprobada por la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) es el anticuerpo monoclonal anti-EGFR Cetuximab (Erbitux®). Este agente, dirigido contra el dominio de unión al ligando de EGFR, es capaz de inhibir la señalización de EGFR y, por tanto, el crecimiento y supervivencia celular, y ha demostrado mejoras en las tasas de supervivencia en diferentes ensayos clínicos cuando ha sido combinado con quimioterapia o radioterapia (Specenier & Vermorken, 2013). Sin embargo, los resultados de mejora de la supervivencia son menores que los esperados inicialmente, ya que los pacientes desarrollan resistencia al Cetuximab tras un beneficio inicial, al ser las células capaces de compensar la inhibición utilizando otras vías de señalización redundantes (Brand *et al.*, 2011). Se han puesto en marcha numerosos ensayos estudiando su combinación bien con quimioterapia o

radioterapia, o bien con otros inhibidores de tirosina kinasas de vías independientes de EGFR, aunque los resultados siguen sin ser los ideales. Por ello, se han de explorar otras dianas, buscando nuevos biomarcadores y receptores a los que dirigir las terapias para evitar la aparición de mecanismos de resistencia al tratamiento.

Con todas las limitaciones y retos anteriormente expuestos, surge la necesidad de explorar nuevas estrategias que puedan contribuir al diagnóstico temprano del CCC y a una mejor delimitación de las zonas a tratar, e incluso que permitan el tratamiento simultáneo “preventivo” de los márgenes quirúrgicos de seguridad para evitar la aparición de recurrencias, y que finalmente tengan mayor especificidad y, por tanto, menos efectos secundarios que los abordajes convencionales. En este contexto, el uso de la nanotecnología ha supuesto toda una revolución en el área de la oncología, al aportar estrategias de diagnóstico y tratamiento alternativas que pueden suponer un gran apoyo a las técnicas existentes.

2. Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica. El prefijo *nano-* hace referencia a la milmillonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), que se definen como aquellos con al menos una dimensión del tamaño entre 1 y 100 nanómetros. Sin embargo, la definición en función de un tamaño límite está siendo cuestionada, ya que lo realmente importante es que, con la reducción a esta escala de tamaño, los materiales presentan nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas únicas y diferentes al material masivo, convirtiéndose en materiales prometedores para diversas áreas. Se trata por tanto de un campo multidisciplinar que requiere la colaboración de especialistas en distintos campos.

Introducción

La aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina es lo que se conoce como nanomedicina. En la Figura 2 puede apreciarse cómo el tamaño de los nanomateriales (NMs) corresponde con el rango de tamaño de muchas estructuras biológicas, lo que va a permitir que interactúen con ellas e interfieran en diversos procesos celulares. Las diferentes aplicaciones de la nanomedicina se pueden englobar en tres grandes áreas, relacionadas entre sí: diagnóstico, terapia y medicina regenerativa. En los últimos años han sido muchos los avances y ensayos dedicados al empleo de nanomateriales en las mencionadas áreas, destacando especialmente en el campo de la oncología.



Figura 2. Escala representativa de diferentes tamaños en comparativa con el rango nanométrico.

2.1. Nanomateriales

2.1.1. Propiedades generales

Existen NMs desde el origen de los tiempos, aunque sólo desde las últimas décadas ha sido posible modificar las estructuras moleculares de manera intencionada dentro de la escala nanométrica. Fue en 1959 cuando el físico y premio Nobel Richard Feynman, considerado padre de la nanotecnología, propuso en su charla “*There is plenty of room at the bottom*” (“Hay mucho sitio al fondo”) el desarrollo de este nuevo campo de estudio a escala atómica y molecular: “*Los principios de la física, hasta donde puedo entender, no están en contra de la posibilidad de manipular las cosas átomo a átomo. [...] Es*

algo que en principio se puede hacer, pero en la práctica no se ha hecho porque somos demasiado grandes”.

Como se ha introducido, la cualidad más importante y característica de los nanomateriales es el cambio que sufren sus propiedades físico-químicas cuando se trabaja a esta escala. Una de las más destacadas es su elevada relación superficie/volumen (S/V), que va a afectar a sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y térmicas. Además, debido al confinamiento cuántico (de electrones, huecos, fonones) o en general a la longitud característica de una propiedad (longitud de coherencia, recorrido libre-medio, tamaño del excitón) a un volumen menor, se propicia la aparición de nuevas propiedades magnéticas, ópticas y eléctricas radicalmente diferentes a las del mismo material a gran escala (Dolez, 2015).

De cara a sus aplicaciones biomédicas, el tamaño y las propiedades superficiales de los NMs van a ser parámetros clave que van a afectar a la tasa de captación por parte de las células. Además, la elevada relación S/V va a permitir la unión de un gran número de moléculas que van a servir para determinar el destino de los NMs. De hecho, tras la exposición a medios biológicos, gracias a la similitud de tamaños son capaces de rodearse de una capa de proteínas, denominada biocorona, que va a conferirles una identidad biológica (Monopoli *et al.*, 2012).

2.1.2. Clasificación

Existen diferentes criterios para clasificar los nanomateriales (ver Figura 3) (Dolez, 2015). Probablemente uno de los más empleados es el relacionado con su composición química, encontrando cuatro tipos de nanomateriales:

- Basados en metales y aleaciones: dentro de esta categoría se incluyen nanomateriales de oro, plata, cobre, hierro, platino o los puntos cuánticos (*quantum dots*). También podría incluirse un subgrupo de

Introducción

óxidos metálicos, como son el dióxido de titanio, el óxido de zinc, el óxido de silicio (sílice) o los óxidos de hierro.

- Basados en carbono: se incluyen en este grupo aquellos nanomateriales compuestos principalmente por carbono, como son el grafeno, los fullerenos, los nanotubos de carbono o las nanofibras de carbono.
- Poliméricos: se tratan de polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. Presentan forma tridimensional de construcción arborescente.
- Compuestos: estos materiales se forman por la unión de dos o más materiales, con el fin de conseguir mejorar las propiedades de los materiales originales por separado.

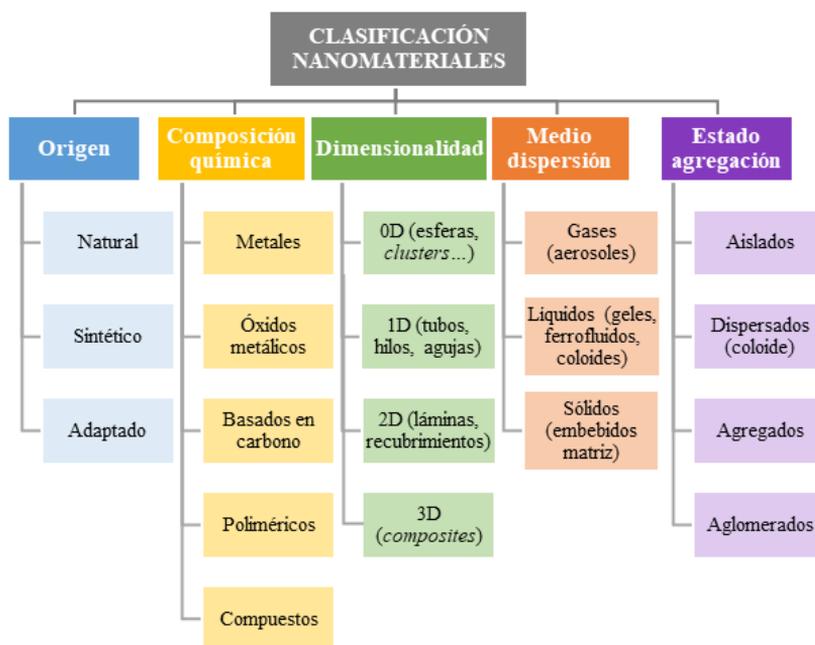


Figura 3. Clasificación de los nanomateriales atendiendo a diferentes criterios.

A esta lista se van uniendo otros como los MOF (*metal-organic frameworks*), los aluminosilicatos (arcillas, zeolitas) y sistemas lipídicos (micelas, liposomas). En función de las propiedades que se quieran explotar, se pueden encontrar NMs con aplicaciones en biomedicina y en la oncología en todos los grupos mencionados. En esta Tesis Doctoral se ha escogido trabajar con metales y óxidos metálicos, concretamente con oro y óxido de hierro, así como en modificaciones de superficie para adecuarlos a sus aplicaciones en CCC. En los siguientes apartados se desarrollarán las principales propiedades de dichos materiales, y la aplicabilidad de éstas en diagnóstico y terapia.

2.2. Nanomateriales de oro

El oro es el elemento noble por excelencia. Por su naturaleza, es altamente inerte y estable, lo que hace que resulte un nanomaterial de gran atractivo para numerosas aplicaciones, entre ellas la biomedicina. Los NMs de oro destacan fundamentalmente por sus propiedades ópticas. Éstas se deben al fenómeno conocido como resonancia del plasmón de superficie (SPR). Tras recibir un haz de luz incidente, se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas como consecuencia de la fuerte interacción con el campo eléctrico de la luz. Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la luz incidente y de la oscilación de los electrones de superficie, fenómeno denominado SPR (ver Figura 4A). La intensidad de la banda y la longitud de onda del SPR dependen de factores que afectan a la densidad de carga de los electrones en la superficie de la partícula, como son el tipo de metal (destacan oro y plata sobre otros metales), el tamaño, la forma, la estructura y la constante dieléctrica del medio que las rodean (Liz-Marzán, 2006). Esto se describe mediante la teoría de Mie (Mie, 1908). Las NPs de oro pequeñas (~10 nm) presentan el SPR alrededor de los 520 nm, en la región visible. A medida que aumentan su tamaño, la longitud de onda se desplaza hacia mayores longitudes de onda del espectro visible.

Introducción

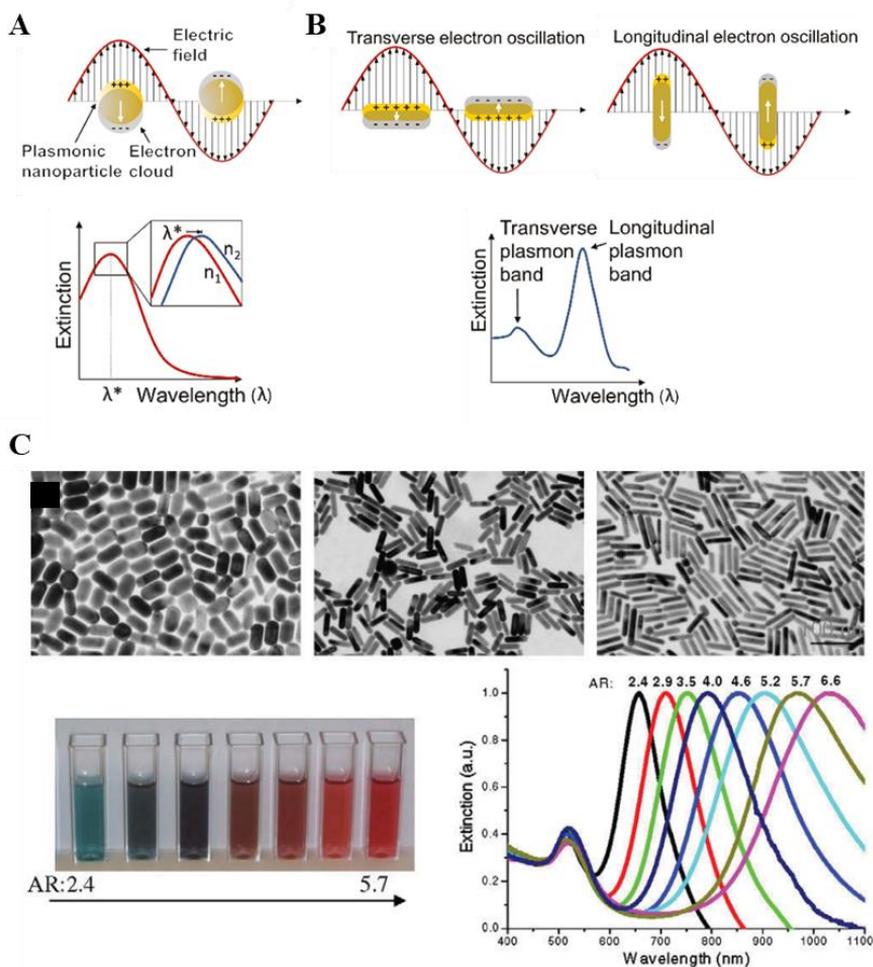


Figura 4. Modificación de las propiedades ópticas de los NMs de oro en función de su forma y tamaño. Oscilaciones del plasmón de superficie en NPs esféricas (A) y nanorods (AuNRs) (B), los cuales presentan oscilaciones asociadas tanto a su eje longitudinal como al eje transversa, dando lugar a dos bandas en su espectro de extinción. (C) AuNRs de diferente relación de aspecto, visible en TEM, por su diferente color y por su variación en la longitud de onda de SPR, con desplazamientos de la banda del SPR longitudinal a mayores longitudes de onda conforme aumentan su relación de aspecto. Imágenes tomadas de las referencias (Xavier *et al.*, 2018) (A y B), y (Huang & El-Sayed, 2010) (C).

No solo el tamaño hace que cambien las propiedades ópticas de las NPs de oro, también su forma. Las NPs no esféricas tienen dos bandas plasmónicas relacionadas con oscilaciones de electrones transversales y longitudinales

(Figura 4B). La banda transversal aparece en torno a los 520 nm, al igual que en el caso de las NPs esféricas, y es independiente del tamaño; la banda longitudinal se localiza en la región NIR, desplazándose en función del tamaño de la partícula. En el caso de los *nanorods* (AuNRs), a mayor relación de aspecto (relación longitud/ancho), la banda se desplaza a mayores longitudes de onda (Figura 4C). Esta propiedad óptica puede explicarse mediante una extensión de la teoría de Mie, la teoría de Gans (Gans, 1912).

La extinción de la luz (atenuación de la intensidad del haz incidente) tras interactuar con las NPs puede tener lugar por dos procesos: absorción y dispersión. La absorción de luz resulta de la promoción de electrones entre los niveles atómicos o moleculares de energía de material y su consiguiente emisión en forma de luz (fotoluminiscencia) o de calor (relajación multifonónica). La dispersión de la luz tiene lugar cuando la energía de los fotones provoca oscilaciones en los electrones de la NP, que emite fotones en forma de luz a la misma frecuencia que la luz incidente (*scattering* elástico o dispersión Rayleigh), o bien a otra frecuencia (*scattering* inelástico o dispersión Raman) (Huang & El-Sayed, 2010). Debido al efecto SPR, estos NMs se emplean para la detección de procesos de absorción, dispersión o emisión de luz, ya que se ven aumentados hasta 5-6 órdenes de magnitud si se compara con las mismas moléculas aisladas (Jain *et al.*, 2006).

La contribución de la absorción o la dispersión al SPR va a depender de nuevo de la morfología de las NPs (forma y tamaño). En partículas de alrededor de 20 nm, solo contribuye la absorción a la extinción de la intensidad de luz. A medida que va aumentando el tamaño de la NP, empieza a aumentar la contribución de la dispersión, que finalmente se equipara a la contribución de la absorción cuando el tamaño de la NP se acerca a los 100 nm (Jain *et al.*, 2006). Esta diferencia de contribuciones dependiendo del tamaño, hace que en función de la aplicación deseada sean más convenientes unas partículas u otras. Así, las NPs más grandes son de mayor utilidad para aplicaciones de imagen y

Introducción

sensores por su mayor eficiencia de dispersión, por ejemplo, para aplicaciones en SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*), mientras que aquellas con mayor eficiencia de absorción, son más interesantes de cara a realizar terapias basadas en hipertermia inducida por luz. Cambiando la forma de las NPs esféricas a otras como los NRs, nanoestrellas o nanocubos, además de cambiar la longitud de onda de la banda del SPR hacia mayores longitudes de onda (región NIR), se incrementan sus secciones eficaces de absorción y dispersión, mejorando por tanto sus propiedades ópticas (Jain *et al.*, 2006).

Por todas estas características y por ser una forma de síntesis sencilla y fácilmente ajustable para conseguir las propiedades ópticas deseadas, en esta Tesis se ha elegido trabajar con AuNRs como NM basado en oro para su aplicación en el modelo escogido de CCC como terapia, mediante hipertermia fotoinducida, y en diagnóstico, mediante un recubrimiento fluorescente con una funcionalización de direccionamiento (detalles en próximos Apartados).

2.2.1. Aplicaciones de los AuNRs en la nanomedicina del cáncer

- **Biocompatibilidad**

De acuerdo con los resultados de numerosos estudios, se considera que los NMs de oro, incluyendo los AuNRs, son biocompatibles o no tóxicos al ser un material relativamente inerte. No obstante, sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo tamaño, forma y modificaciones superficiales, son factores clave que pueden afectar a la citotoxicidad. Por ejemplo, se conoce que la citotoxicidad de los AuNRs recubiertos con el surfactante empleado para su síntesis, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), viene dada por el CTAB y no por los AuNRs en sí, ya que modificando la química superficial se revierten los efectos (Alkilany *et al.*, 2012). Ante las conclusiones contradictorias que arrojan las diferentes publicaciones, serían necesarios estudios más exhaustivos y estandarizados para conocer los posibles efectos nocivos de los AuNRs, así como su acumulación y destino en el organismo a largo plazo (Alkilany & Murphy, 2010; Alkilany *et al.*, 2009).

- **Diagnóstico**

In vitro

Los AuNRs tienen la capacidad de aumentar la dispersión Raman de moléculas cercanas, a través del anteriormente mencionado efecto SERS (Huang & El-Sayed, 2010). Esta propiedad ha sido aprovechada para el desarrollo de sensores moleculares ultrasensibles. Para el diagnóstico del cáncer, los diseños se basan en la unión al AuNR de una sonda Raman y un ligando que se une específicamente a un determinado receptor o molécula expresados en las células tumorales. De esta forma, cuando los AuNRs se unen específicamente a su diana, se produce una señal Raman intensificada (Abalde-Cela *et al.*, 2010; Alvarez-Puebla & Liz-Marzán, 2010). Con esta técnica, es posible identificar nuevos biomarcadores, polimorfismos en nucleótidos e incluso células tumorales circulantes, así como análisis histológicos en tejidos procedentes de biopsias (Vendrell *et al.*, 2013).

In vivo

Gracias a sus propiedades ópticas, los AuNRs están demostrando ser agentes de contraste eficaces para diferentes técnicas de imagen biomédica emergentes, como son la microscopía de dos fotones, la tomografía de coherencia óptica, la tomografía fotoacústica o la tomografía axial computerizada de rayos X (Huang *et al.*, 2009). De todas ellas, la tomografía de rayos X sea probablemente una de las más utilizadas por disponibilidad, coste y eficacia. Se basa en el uso de un agente de contraste, siendo los convencionales moléculas yodadas o sulfatos de bario, para obtener información tanto anatómica como funcional con alta resolución espacial. En comparación con los agentes de contraste actuales, de masa atómica moderada, los AuNRs ofrecen una mayor masa atómica que se traduce en una mayor atenuación de los rayos X, proporcionando imágenes con mayor contraste y resolución a dosis de radiación más bajas (Cole *et al.*, 2015).

- **Terapia**

Los AuNRs tienen la capacidad de transformar de manera eficiente la luz absorbida en calor, resultandos útiles para un tratamiento basado en hipertermia localizada inducida por luz (fototerapia, Figura 5). La diferencia frente a la hipertermia tradicional radica en que el calentamiento solo tiene lugar en el área directa alrededor de los AuNRs, de manera local y alcanzando incrementos de temperatura capaces de inducir la muerte celular en tiempos más cortos. Esto implica una importante reducción de efectos secundarios sobre tejidos sanos.

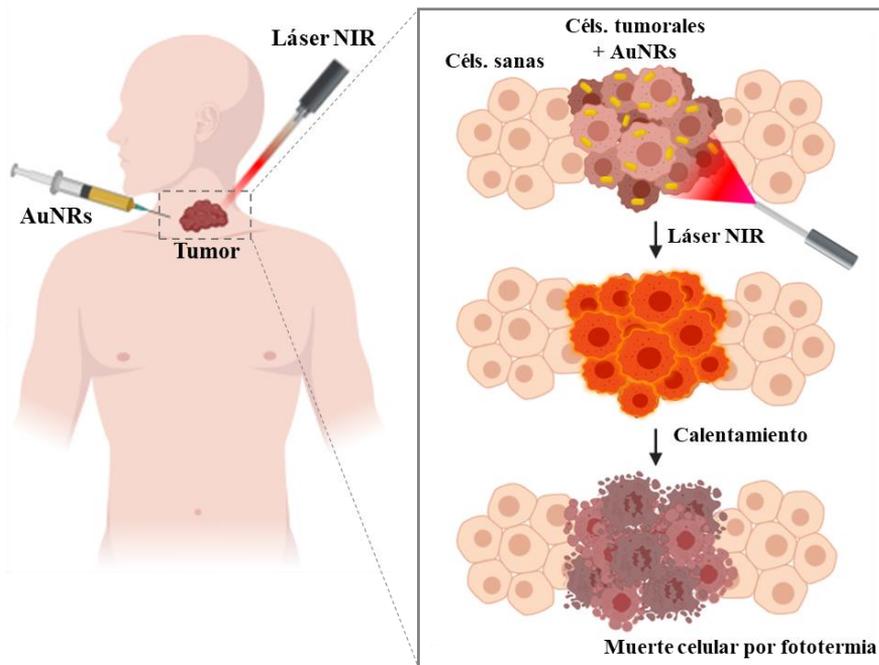


Figura 5. Esquema del mecanismo de la terapia fototérmica usando AuNRs. Tras la administración de AuNRs (vía intratumoral o vía sistémica con la adecuada funcionalización), las células tumorales van a captarlos e internalizarlos. Tras la irradiación focalizada con un láser NIR (endoscopio) sobre el tumor, las células tumorales van a ser destruidas gracias al calentamiento de los AuNRs que tienen en su interior, obteniendo un tratamiento selectivo y localizado con efectos secundarios mínimos.

Para ello, es necesario irradiar la zona de interés con un láser que pueda penetrar la piel y ciertos tejidos, es decir, un láser cuya longitud de onda se encuentre en las conocidas como ventanas biológicas. Éstas se definen como los rangos espectrales en los que los tejidos son parcialmente transparentes por una reducción tanto de la absorción como de la dispersión por parte de los tejidos y otras moléculas biológicas. La primera ventana se extiende de los 700 a los 980 nm y corresponde al rango entre la absorción de la hemoglobina y los sobretonos correspondientes a la absorción del agua. La segunda ventana biológica se extiende de los 1000 a los 1400 nm, límites dados por las bandas de absorción del agua. La ventaja que ofrecen los AuNRs es que su relación de aspecto puede modificarse en su síntesis para obtener la banda de absorción a lo largo de estas ventanas, especialmente en la primera (Jaque *et al.*, 2014).

Además, se puede tener aún más control sobre las células a tratar funcionalizando los AuNRs para dirigirlos selectivamente a receptores sobreexpresados en células tumorales. Existen numerosos estudios en esta línea, con el fin de tratar diferentes tipos de cáncer. Los primeros fueron llevados a cabo en líneas celulares tumorales de epitelio oral y carcinoma escamoso, utilizando AuNRs funcionalizados con anticuerpos anti-EGFR para dirigir a células con sobreexpresión de dicho receptor (El-Sayed *et al.*, 2006). Tras la exposición a un láser NIR, se obtuvo una destrucción selectiva de las células tumorales sin dañar a las sanas. El calentamiento de los AuNRs también puede aplicarse para la liberación controlada de fármacos encapsulados en recubrimientos termosensibles (Z. Zhang *et al.*, 2014), ofreciendo así una gran versatilidad y opciones múltiples de tratamiento.

2.3. Nanopartículas magnéticas

El interés de las NPs magnéticas en biomedicina viene dado por las propiedades físicas que aporta su núcleo magnético, por su síntesis sencilla y su alta biocompatibilidad (Colombo *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2015). La

Introducción

magnetita (Fe_3O_4), así como su forma oxidada, la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), son los materiales magnéticos más utilizados para aplicaciones biomédicas. Estos óxidos de hierro presentan importantes propiedades magnéticas dependientes del tamaño de las NPs.

De cara a aplicaciones biomédicas, se busca que las NPs magnéticas presenten un comportamiento superparamagnético, es decir, que su magnetización desaparezca cuando se retire el campo magnético aplicado. Esto implica que, en ausencia de campo, no van a existir remanencia o campos coercitivos, previniendo interacciones entre las NPs y, por tanto, su agregación (Kandasamy & Maity, 2015). Por otra parte, la magnetización de saturación de la NP debe ser lo mayor posible para garantizar el máximo aprovechamiento de las propiedades magnéticas, es decir, la capacidad de calentamiento para su aplicación en hipertermia magnética (ver Apartado 2.4.1.). Esta característica, así como el comportamiento magnético, van a estar directamente relacionados con el tamaño de las NPs. A mayor tamaño, mayor va a ser la magnetización de saturación; sin embargo, por encima de cierto límite de tamaño, se dan otros tipos de comportamiento distintos del superparamagnetismo. Así, por debajo de un diámetro de 25 nm en el caso de las NPs de magnetita, y por debajo de 30 nm en el caso de la maghemita, las NPs van a ser superparamagnéticas. No obstante, para evitar las fuerzas de atracción de tipo van der Waals, va a ser necesario un recubrimiento adicional que minimice la agregación de las NPs (ver Apartado 2.5.1.) (Estelrich *et al.*, 2015).

2.3.1. Aplicaciones NPs de óxidos de hierro en cáncer

- **Biocompatibilidad**

Las NPs con núcleos de óxidos de hierro son uno de los NMs considerados como más biocompatibles. Tras la degradación de estas NPs, el exceso de iones de hierro en los órganos se regula a través de los mecanismos de eliminación innatos del organismo. Las NPs, una vez captadas por los macrófagos del

sistema fagocítico mononuclear, se degradan en los lisosomas por su ambiente ácido, y los iones de hierro liberados se unen a las proteínas apoferritina presentes en el citoplasma para formar ferritina. De ahí pasan a unirse a la apotransferrina para formar transferrina, que circula en el organismo para transportar hierro a diferentes tejidos como la médula ósea o los músculos, donde van a formar parte de la hemoglobina y la mioglobina, respectivamente (Arami *et al.*, 2015; Weissleder *et al.*, 1989).

No obstante, como ocurre con prácticamente todos los NMs, en esta biocompatibilidad van a influir diferentes factores como el tamaño, la carga y química superficial, el recubrimiento y la dosis de las NPs (Feng *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2012; Soenen *et al.*, 2011). Se ha descrito que, a concentraciones elevadas, estas NPs pueden producir un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que puede desembocar en una respuesta inflamatoria y daños en ADN que lleven finalmente a la muerte celular por apoptosis (Naqvi *et al.*, 2010; Soenen *et al.*, 2011). Sin embargo, suele tratarse de efectos agudos pero transitorios, desapareciendo al cabo de horas o pocos días.

- **Diagnóstico: agentes de contraste en MRI**

La imagen por resonancia magnética (MRI) es una de las técnicas más utilizadas en el diagnóstico clínico al aportar un alto contraste de los tejidos blandos, resolución espacial y profundidad de penetración. El contraste endógeno en los tejidos blandos viene dado por las diferencias locales en densidad de protones, es decir, en concentración de agua, resultando en diferentes tiempos de relajación (T_1 y T_2) de dichos protones. Así, el contraste endógeno va a depender de la naturaleza físico-química de los tejidos. Sin embargo, en muchas ocasiones el contraste no es el suficiente como para la detección de una patología de interés. En estos casos, se suelen administrar agentes de contraste para mejorar las imágenes mediante la disminución de los tiempos de relajación de los protones de agua en la región de interés. En el caso

Introducción

de los tumores, al tener un metabolismo diferente a los tejidos sanos, captan estos agentes de contraste de manera diferencial, proporcionando contraste en las imágenes.

Los agentes de contraste convencionales se han basado en quelatos de gadolinio. Sin embargo, se ha visto que su uso puede desencadenar algunos efectos secundarios renales en determinados pacientes; sumado a la poca especificidad y a la rápida extravasación de estos agentes, se han explorado diferentes alternativas, como el uso de NPs. En el caso de las NPs de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ superparamagnéticas, son agentes de contraste T_2 o agentes de contraste negativo, ya que producen señales hipointensas en imágenes potenciadas en T_2 al disminuir el tiempo de relajación, apareciendo más oscuras las zonas que captan estas NPs (ver Figura 6) (Estelrich *et al.*, 2015).

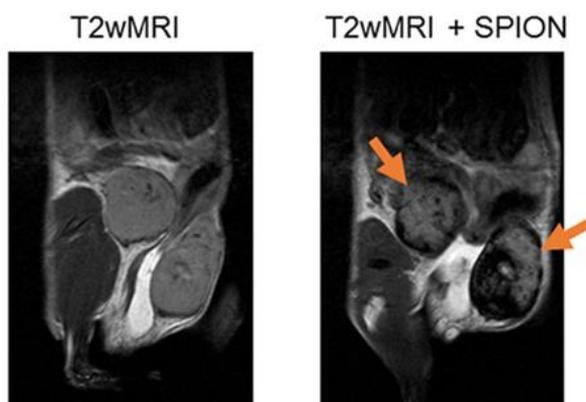


Figura 6. Ejemplo del contraste aportado por NPs de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIO) en RMI. La imagen de la izquierda muestra la imagen por RMI tomada antes de la administración de las NPs, y a la derecha la imagen 24 h post-inyección de las NPs. Al provocar una disminución del tiempo de relajación T_2 , se produce una señal más oscura en imágenes potenciadas en T_2 : en este caso, se mejora el contraste para la visualización de tumores de la glándula mamaria en un ratón (flechas naranjas). Imagen tomada de la referencia (Serkova, 2017).

Las NPs de óxido de hierro han sido precisamente de las pocas NPs metálicas que han llegado a ser aprobadas para su uso en clínica por la FDA, para su uso

como agentes de contraste (Feridex®, Resovist® o Sinarem®). Sin embargo, tras llevar comercializadas desde los años 90, fueron retiradas en el año 2009 aparentemente por falta de ventas y por no haberse demostrado suficientemente su eficacia. En la actualidad, únicamente sigue aprobado el ferumoxytol como tratamiento para la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica, pero también como agente para angiografía por MRI para pacientes que no pueden tomar agentes de contraste con Gd (Bobo *et al.*, 2016; Thakor *et al.*, 2016).

En este contexto, siguen explorándose nuevas variaciones que mejoren los resultados ofrecidos por los agentes convencionales, mediante el direccionamiento específico de las NPs y mejorando la composición de cara a su biocompatibilidad.

- **Terapia**

- Hipertermia magnética***

La hipertermia magnética se basa en la capacidad de las NPs magnéticas para transformar en calor la energía aplicada con un campo magnético alterno. Este calentamiento se produce por pérdidas de energía mediante relajaciones de Néel (por rotación del espín) y de Brown (por rotación de la partícula). La activación de estas NPs puede controlarse externamente mediante la aplicación de un campo magnético alterno; al utilizarse NPs superparamagnéticas, dejará de haber un calentamiento cuando se retire el campo externo. El campo magnético empleado en hipertermia magnética está en el rango de la radiofrecuencia (entre varios kHz y 1 MHz), radiación totalmente inocua y con suficiente capacidad de penetración para acceder a tejidos y órganos internos (Bañobre-López *et al.*, 2013). El calor generado va a depender del tamaño y morfología de las NPs, de su concentración, de la intensidad del campo magnético aplicado y de su frecuencia (Deatsch & Evans, 2014). Una desventaja asociada a la hipertermia magnética es que normalmente los

Introducción

campos magnéticos alternos se aplican a grandes zonas del cuerpo sin poder centrarse en la zona tumoral. Esto implica que, si las NPs alcanzan otras células y tejidos que no sean la diana, también pueden calentarse generando efectos secundarios indeseados.

Otra forma de explotar la capacidad de calentamiento de estas NPs es para su uso en la liberación de fármacos dirigida. Diseñando una NP para que encapsule un agente terapéutico bajo un polímero termosensible, se puede controlar la liberación a demanda con la aplicación de un campo magnético externo de baja frecuencia (Yildiz & Yildiz, 2015).

Hipertermia fotoinducida.

Aunque la hipertermia magnética es la forma de calentamiento que más ha sido estudiada en NPs magnéticas, estas NPs también presentan la capacidad de calentarse mediante la absorción luz. A pesar de no presentar bandas características de absorción como en otros materiales como el oro (Y. P. He *et al.*, 2005), se ha demostrado que las NPs de óxidos de hierro son capaces de absorber luz en diferentes regiones del espectro UV-vis y NIR, independientemente de la forma de las NPs (Chu *et al.*, 2013), en cantidades suficientes como para provocar un calentamiento capaz de destruir células tumorales tanto *in vitro* (J. Yang *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2014) como en modelos *in vivo* (Chen *et al.*, 2014). Gracias a las propiedades magnéticas de las NPs, se ha estudiado la combinación de la hipertermia magnética con la modalidad fotoinducida, obteniendo un efecto sinérgico con un calentamiento hasta 15 veces superior a las modalidades individuales, reduciendo considerablemente la dosis necesaria para tratamiento que normalmente requieren las NPs para hipertermia magnética. Otra manera de aprovechar las propiedades magnéticas, es ejercer una atracción previa de las NPs al tumor con la ayuda de un campo magnético externo, para localizar más NPs en la zona previamente al calentamiento con un láser (Shen *et al.*, 2013).

2.4. Hipertermia e importancia de la determinación de la temperatura

La hipertermia se ha introducido recientemente como una terapia adyuvante contra el cáncer. Se define como un tratamiento en el que el tejido diana se expone a altas temperaturas para destruir directamente las células tumorales, o bien para hacer a las células más susceptibles a otras modalidades de tratamiento como la quimio o la radioterapia.

La hipertermia puede afectar a las células de diferentes maneras, ya que puede alterar la estructura de lípidos, nucleótidos y proteínas (Figura 7). En el caso de los lípidos, los efectos suelen ser reversibles, mientras que los daños en el ADN (por ejemplo, roturas de la doble cadena) son menos fáciles de revertir. Sin embargo, los principales efectos de la hipertermia vienen dados por los producidos en las proteínas; a partir de ~40 °C, comienza a haber una desnaturalización parcial de las proteínas (Lepock *et al.*, 1988), que se ve acompañada de la sobreexpresión de las chaperonas moleculares conocidas como proteínas de choque térmico o *heat-shock proteins* (familia de las Hsp, como la Hsp70), para revertir el efecto y replegar de nuevo las proteínas. A temperaturas más elevadas, por encima de 47 °C, la desnaturalización es irreversible y se produce una agregación de proteínas mal plegadas (Leuenberger *et al.*, 2017; Roti, 2008). Esto se va a traducir en la inhibición de numerosos procesos celulares, como pueden ser la parada del ciclo celular, la inactivación de la síntesis de proteínas y la inhibición de la síntesis y reparación del ADN, provocando finalmente la muerte celular. Al desensamblarse el citoesqueleto, la motilidad celular también se ve afectada. En cuanto al efecto sobre el metabolismo de la célula, va a haber una disminución del ATP (adenosín trifosfato) disponible, así como un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Todos estos cambios propician, además, la pérdida de la integridad de la membrana celular (Clavel *et al.*, 2015; Hildebrandt *et al.*, 2002).

Introducción

El aumento de temperatura va a tener efectos no sólo a nivel intracelular, sino también en el tejido afectado puesto que aumenta la permeabilidad vascular, incrementando el flujo sanguíneo y la oxigenación del tumor. Por tanto, la hipertermia reduce la hipoxia del tejido y podría ser aplicada junto con otros tratamientos para incrementar sus efectos tóxicos. Existen diversos estudios clínicos llevados a cabo en diferentes tumores, incluyendo CCC, que muestran mejoras en el control del tumor y en las tasas de supervivencia de los pacientes (Beik *et al.*, 2016).

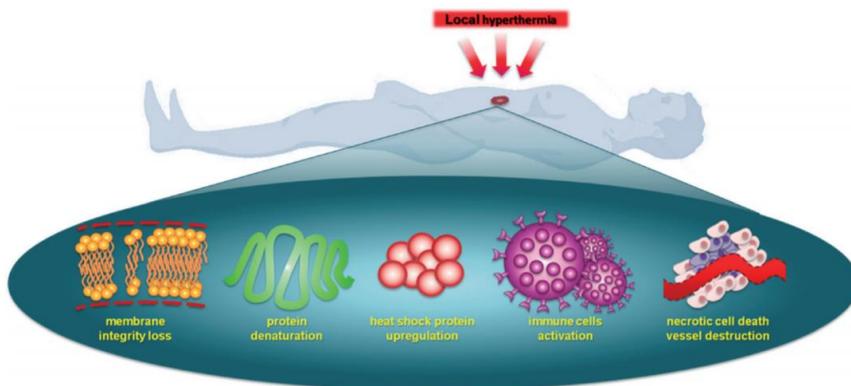


Figura 7. Diferentes mecanismos inducidos por hipertermia: pérdida de la integridad de la membrana celular, aumento de los niveles de proteínas de choque térmico, activación de células del sistema inmune, muerte celular (necrosis o apoptosis) y permeabilización de los vasos sanguíneos tumorales. Imagen tomada de la referencia (Clavel *et al.*, 2015).

La hipertermia fotoinducida mediante el uso de NMs ha supuesto una mejora sobre la hipertermia convencional, al ofrecer una mayor selectividad en la zona al calentar y una mayor eficacia. En la hipertermia clásica, el calor se genera mediante radiación electromagnética con infrarrojos, microondas o radioondas, o bien con ultrasonidos, con una clara limitación en cuanto a la focalización de la zona a tratar. Además, el calentamiento tiene lugar de fuera hacia dentro, ya que se genera un gradiente de temperatura con el máximo en la superficie del cuerpo, que va decreciendo a mayor distancia de la fuente de calor (Figura 8). Así, gran parte de la energía se disipa en tejidos sanos, por lo

que no existe una selectividad en la zona a tratar, provocando efectos secundarios por calentamiento de los tejidos circundantes. El uso de NMs con capacidad de absorber luz en la región NIR, ha permitido el uso de láseres y fibras ópticas endoscópicas para tratar zonas muy concretas, penetrando la luz varios centímetros en función del tejido. En este caso, el calentamiento tiene lugar de dentro hacia fuera, al ser el foco de calor las NPs, minimizando el calentamiento y un posible efecto adverso sobre tejidos sanos.

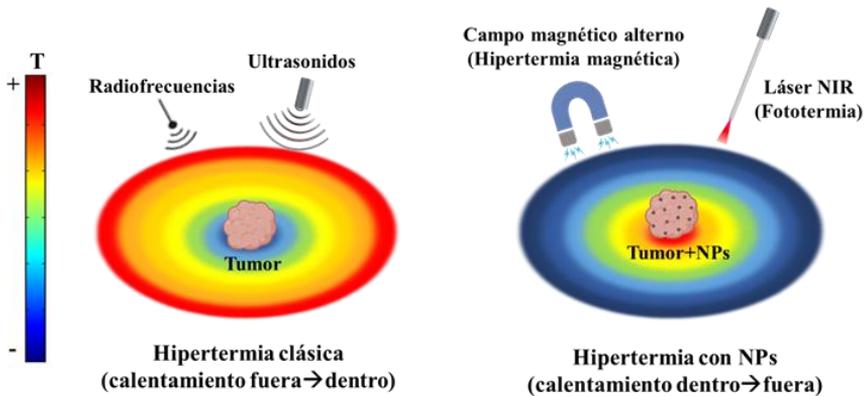


Figura 8. Comparación de la forma de calentamiento en la hipertermia clásica frente a la hipertermia utilizando NPs. La presencia de NPs en el interior de las células tumorales, genera un foco de calentamiento localizado en el tumor tras la aplicación de radiación láser o campos magnéticos alternos.

A pesar de lo prometedor de esta técnica y los buenos resultados que se han obtenido tanto *in vitro* como *in vivo*, todavía quedan diversos retos que afrontar para poder iniciar una traslación a la clínica. El principal es tener un control de la temperatura de calentamiento que se está alcanzando en el interior de las células. Está descrito que la temperatura va a tener un efecto directo en el tipo de muerte celular que va a tener lugar, apoptosis (temperaturas más moderadas, por debajo de $\sim 47^{\circ}\text{C}$) o necrosis (generalmente por encima de 50°C). Por ello, es clave controlar cuál de los dos mecanismos tiene lugar, ya que la necrosis puede desembocar una cascada de procesos pro-inflamatorios (Rock & Kono,

2008) que podrían provocar daños en tejidos sanos adyacentes, efectos secundarios que precisamente se pretenden evitar con este tipo de técnicas.

2.4.1. Nanotermómetros

Para optimizar las condiciones del tratamiento con fototerapia, sería necesario conseguir una monitorización continua de la temperatura durante todo el tratamiento, de manera que se cese la irradiación con el láser una vez que alcanzada la temperatura necesaria para ejercer un efecto citotóxico, evitando un calentamiento excesivo e innecesario que resultaría en muerte celular por necrosis, mecanismo no deseado por los potenciales efectos pro-inflamatorios que podría desencadenar. En este contexto, los nanomateriales ofrecen también soluciones para el desarrollo de nanotermómetros, que gracias a su reducido tamaño pueden incorporarse fácilmente en células y tejidos tumorales.

Idealmente, la determinación de la temperatura tiene que realizarse con técnicas que no requieran contacto directo de una sonda con la muestra, con el fin de tener un método lo menos invasivo posible. Para ello, las principales estrategias se basan en el uso de moléculas o NPs luminiscentes, en las que mediante un análisis espectral de la sonda emisora se pudiera determinar la temperatura con resolución espacial submicrométrica (Brites *et al.*, 2012). La sonda, además, debe ser específica para la temperatura, de manera que la emisión no se vea influenciada por otros parámetros como el pH o la composición del entorno.

Las NPs dopadas con iones de lantánidos son una familia de NMs que puede diseñarse para emitir luz en todo el rango del espectro UV-vis-NIR. Los lantánidos comprenden el conjunto de átomos de la sexta fila de la tabla periódica, desde el cerio al yterbio, y junto al ytrio y el escandio forman el grupo de elementos denominados tierras raras. Poseen una configuración electrónica singular, ya que sus orbitales $4f$ están parcialmente llenos, mientras que los orbitales menos energéticos $5s$ y $5p$, más externos, están llenos. En

otras palabras, los electrones correspondientes a los orbitales $4f$ están apantallados por los correspondientes a $5s$ y $5p$. Presentan múltiples estados energéticos excitados desde los que se produce luminiscencia; estas transiciones intraconfiguracionales $4f-4f$ entre multipletes $^{2S+1}L_J$ debido a dicho apantallamiento, dan lugar a picos estrechos de absorción y emisión, que apenas van a estar influenciados por el entorno o por la red cristalina en la que se incorporen. La intensidad de luminiscencia de las tierras raras depende de diferentes parámetros, entre los cuales la temperatura es uno de los más críticos. Estas características hacen de ellos excelentes candidatos para el desarrollo de nanotermómetros ópticos (Brites *et al.*, 2019, 2011; Jaque & Vetrone, 2012; Quintanilla & Liz-Marzán, 2018).

De todos los lantánidos, el ion más empleado en termometría es el erbio (Er^{3+}), ya que sus dos multipletes $^4S_{3/2}$ y $^2H_{11/2}$ están separados por una diferencia de energía suficientemente pequeña como para que estén termalizados, resultando en emisiones en la región de 530 y de 550 nm que son sensibles a la temperatura (ver Figura 9). Sin embargo, es el hecho de que la fuerza de oscilador de la transición $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ sea mucho mayor que la $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ el que hace que, aunque esta diferencia de energía sea próxima a los 800 cm^{-1} , una pequeña población en el multiplete $^2H_{11/2}$ sea suficiente para su detección. Esto hace que, con la energía térmica ($k_B T$), un electrón del estado de menor energía ($^4S_{3/2}$) pueda promocionar al de mayor energía ($^2H_{11/2}$); este cambio de poblaciones supone por tanto un cambio en las intensidades de emisión. Así, la relación de intensidades de fluorescencia (FIR) entre las emisiones de los dos niveles en función de la temperatura, se puede relacionar con una distribución de Boltzmann:

$$FIR = \frac{I_2}{I_1} = C \exp\left(\frac{-\Delta E}{k_B T}\right) \rightarrow \ln(FIR) = \ln \frac{I_2}{I_1} = \ln C - \frac{\Delta E}{k_B T}$$

donde I_2 e I_1 son las intensidades integradas desde el nivel de mayor y menor energía, respectivamente, C es una constante con significado microscópico que

Introducción

depende del material, k_B la constante de Boltzmann y ΔE la diferencia de energía entre los dos niveles termalizados. Gracias a esta ecuación, y representando FIR frente a la temperatura, puede obtenerse una recta de calibrado, que es la empleada para la determinación de la temperatura en posteriores experimentos de calentamiento.

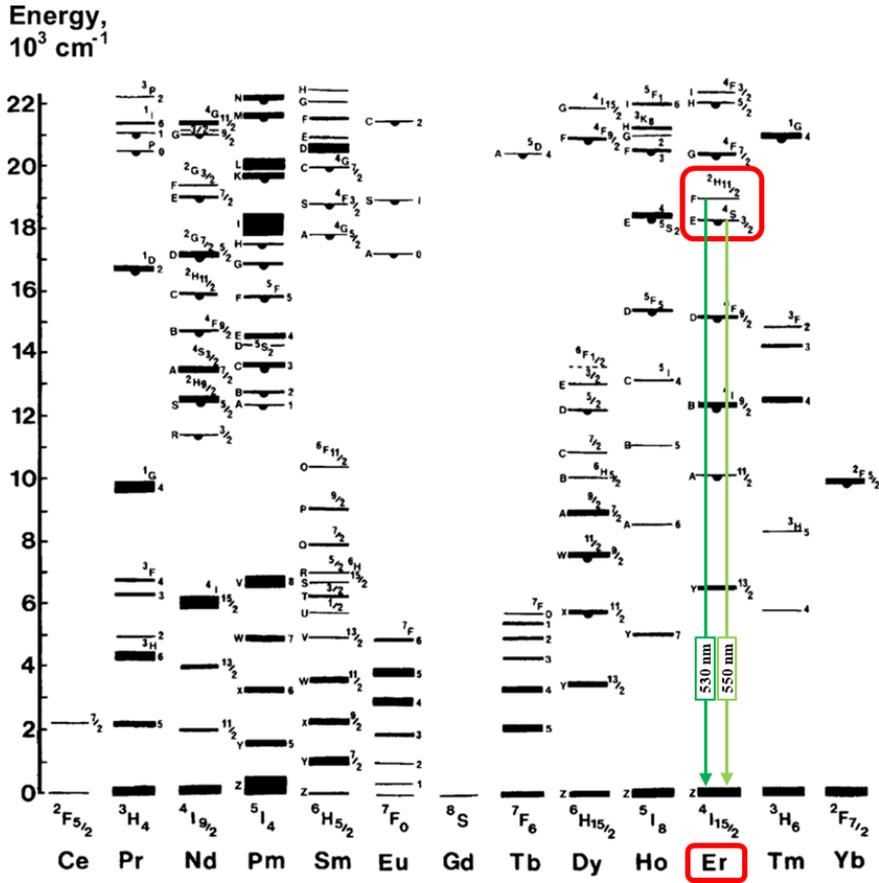


Figura 9. Diagrama de Dieke simplificado. A partir de este diagrama, que recoge las energías de los diferentes estados de los iones de lantánidos, se pueden interpretar los espectros de absorción o emisión. En rojo aparece marcado el Er^{3+} , cuyos niveles termalizados $4S_{3/2}$ y $2H_{11/2}$ emiten en la zona de 530 y 550 nm, respectivamente. Imagen modificada de la referencia (Dieke & Crosswhite, 1968).

En esta Tesis, se ha escogido utilizar Er^{3+} como sonda termosensible, incorporándolo como impureza en una matriz de Y_2O_3 que sirva como

recubrimiento de NMs fotoactivables, con el fin de poder determinar la temperatura de calentamiento de dichos NMs dentro de células, simultáneamente a la irradiación con un láser NIR. Se ha optado por emplear Er^{3+} en el rango visible debido a su fácil caracterización, sensibilidad, optimización en cuanto a eficiencia luminiscente y, finalmente, a que estos nanomateriales se van a emplear de modo tópico y se tendrá acceso mediante sonda endoscópica. En un futuro si fuese necesario su aplicación en tejidos internos se podría optar por sondas en las ventanas biológicas previamente mencionadas (Jaque & Vetrone, 2012; Quintanilla & Liz-Marzán, 2018).

2.5. Modificaciones superficiales de los NMs para aplicaciones biomédicas

2.5.1. Recubrimientos para mejorar estabilidad y biocompatibilidad

Los NMs recién sintetizados, por lo general, no cumplen los requisitos para poder ser utilizadas en aplicaciones biomédicas. En numerosas ocasiones, se requieren métodos de síntesis que dan NMs únicamente dispersables en medios orgánicos, como en el caso de los óxidos de hierro (Gutiérrez *et al.*, 2015), o por ejemplo recubiertos con surfactantes altamente tóxicos para las células, como puede ser el caso del CTAB, crucial para las síntesis de AuNRs (Alkilany *et al.*, 2012). Es por ello por lo que se requiere de algún tipo de modificación previa que aumente la estabilidad de los NMs en fluidos biológicos, reduzca su agregación, evite su toxicidad y una rápida eliminación, a la vez que sirva para dirigirse al lugar de interés.

Esto se consigue recubriendo su superficie mediante diferentes estrategias. Una opción muy extendida es el uso de polímeros, destacando el polietilenglicol (PEG). Al ser un polímero hidrofílico, permite la dispersión acuosa de las nanopartículas. Además, está ampliamente documentado que el recubrimiento con PEG aumenta el tiempo medio de circulación de las NPs en sangre (Pelaz *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2013). También se ha estudiado el

Introducción

recubrimiento con polisacáridos, como es el caso del dextrano, una opción muy extendida especialmente en el caso de NPs magnéticas (Peng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, todas estas estrategias limitan el abanico de posteriores funcionalizaciones con otras moléculas como anticuerpos o proteínas de direccionamiento, que suelen requerir de polímeros modificados en alguno de sus extremos, que pueden resultar muy costosos, o de reacciones químicas relativamente complejas.

Otro recurso muy utilizado por su versatilidad y que se ha elegido para esta Tesis es un recubrimiento de carácter inorgánico con óxido de silicio o sílice (SiO₂). Se trata de un material que presenta transparencia óptica, biocompatibilidad, alta estabilidad química y coloidal, así como un espesor y porosidad controlables (Guerrero-Martínez *et al.*, 2010; X. Zhang *et al.*, 2010). Este recubrimiento mejora la dispersión de NPs en medios acuosos salinos, reduciendo la agregación de las NPs ya que al tener su punto isoeléctrico entre 2 y 3, a pH sanguíneo las NPs estarán cargadas negativamente. Por su química superficial (grupos OH), sirve además de plataforma para la funcionalización con una amplia variedad de ligandos como proteínas, fluoróforos, o incluso otros nanomateriales, permitiendo el desarrollo de nanomateriales multifuncionales (González-Domínguez *et al.*, 2017; Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017). La versión mesoporosa permite, además, la carga de fármacos, péptidos o material genético en sus poros, ofreciendo un sistema de transporte que puede adaptarse también para realizar liberaciones a demanda ante determinados estímulos como el calor o el pH (F. Tang *et al.*, 2012).

2.5.2. Biofuncionalización para direccionamiento

Muchas de las estrategias de tratamiento y diagnóstico del cáncer con NMs se basan en la tendencia que éstos tienen a acumularse de forma pasiva en los tumores gracias al conocido efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR). Cuando un tumor adquiere un determinado tamaño, aproximadamente 2 mm³ de diámetro, la vasculatura presente no es suficiente para proporcionar

el oxígeno que necesita para continuar con su proliferación (Folkman, 1971). Por ello, las células tumorales secretan factores de crecimiento que promueven el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis (Hillen & Griffioen, 2007). Sin embargo, estos nuevos vasos son aberrantes, presentan irregularidades y un epitelio discontinuo (fenestrado), sin membrana basal. Estas fenestraciones en los capilares pueden tener un tamaño entre los 200 y 2000 nm, dependiendo del tumor y su localización. Así, cuando los componentes sanguíneos llegan a estas irregularidades, atraviesan el intersticio del tumor sin resistencia. Por otra parte, existe un aumento de la retención de las NPs en los tumores debido a defectos en el drenaje linfático. En tejido sano, el fluido extracelular se drena continuamente a los vasos linfáticos, renovando el fluido y reciclando de nuevo a la circulación los solutos y coloides que hayan extravasado. En los tumores, esta función linfática está deteriorada, de manera que una vez han alcanzado el área perivascular, las NPs no son recicladas y devueltas a circulación, acumulándose en el intersticio del tumor (Bertrand *et al.*, 2014).

No obstante, se ha visto que el efecto EPR es bastante moderado, ofreciendo únicamente una retención dos veces superior comparando con la retención en órganos sanos. Además, el efecto es mucho más complejo que la definición inicial, ya que se ve afectado por numerosos procesos biológicos que además varían entre pacientes y tipos de tumores: angiogénesis, permeabilidad vascular, regulación hemodinámica, heterogeneidad del tumor y su microambiente, etc. (Maeda *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2016). Además, las propiedades fisicoquímicas de cada NM también van a afectar a su acumulación y distribución. Todo ello indica que no es la mejor estrategia para dirigir selectivamente NMs a tumores.

También hay que tener en cuenta que, tras una administración sistémica, el sistema fagocítico mononuclear y la eliminación vía renal compiten con el tumor por las NPs. El sistema fagocítico mononuclear, comprendido por

Introducción

órganos como el hígado y el bazo, contiene células fagocíticas que captan las NPs para su eliminación. Aquellas NPs con un diámetro menor que 5.5 nm, son eliminadas a través de los riñones. Únicamente aquellas NPs que consigan escapar de estas barreras, tienen alguna oportunidad de llegar a interactuar con el tejido tumoral. Así, el porcentaje de NPs administradas que logran llegar a su destino es muy limitado (Wilhelm *et al.*, 2016).

Con todos estos retos, resulta crucial poder controlar la bio-identidad de los NMs para poder regular las interacciones que ocurren tras su exposición a un medio biológico. Si no están diseñadas específicamente para evitarlo, los NMs en contacto con fluidos biológicos se recubren rápidamente de un determinado grupo de biomoléculas, esencialmente proteínas, para formar una biocorona cuya composición va a regular su interacción con las células y con el sistema inmune y, por tanto, su destino y farmacocinética (Monopoli *et al.*, 2012). No obstante, tanto los NMs como las proteínas de la biocorona se transforman cuando interactúan entre sí. Las proteínas cambian la reactividad de superficie y la naturaleza hidrodinámica de los NMs, provocando una redistribución de manera impredecible (Rana *et al.*, 2010; Saptarshi *et al.*, 2013; Walkey & Chan, 2012). Además, las proteínas adsorbidas en la superficie también pueden sufrir cambios conformacionales críticos tras su unión. Los polipéptidos pueden desplegarse y exponer al ambiente residuos aminoacídicos hidrofóbicos o no polares, que normalmente estarían escondidos en el núcleo de la proteína. Esta desnaturalización parcial supone una señal de alerta para el sistema fagocítico mononuclear, que va a promover la eliminación del NM reduciendo drásticamente su tiempo de circulación en el organismo y, por tanto, su efecto terapéutico (Deng *et al.*, 2011; Saptarshi *et al.*, 2013; Satzer *et al.*, 2016).

Para prevenir todos estos efectos, la estrategia más utilizada es realizar un recubrimiento de los NMs con diferentes ligandos de direccionamiento, así como con moléculas que prevengan la adsorción de una biocorona

inespecífica. Por ejemplo, el PEG es uno de los polímeros más utilizados para recubrir una amplia variedad de NMs, ya que está descrito que aumenta el tiempo de circulación en el organismo al prevenir la adsorción de proteínas séricas y opsoninas que faciliten el reconocimiento y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear, a la vez que permite posteriores funcionalizaciones con otros ligandos. Sin embargo, existen evidencias de que el PEG no es completamente inerte y puede activar una respuesta inmune, generando anticuerpos anti-PEG que reducen el tiempo de circulación de las terapias (Grenier *et al.*, 2018; Q. Yang & Lai, 2015).

Otro reto de la funcionalización es conseguir una adecuada orientación de los ligandos sobre la superficie de las NPs. En el caso de los anticuerpos, la estrategia de conjugación suele basarse en un enlace covalente en los extremos carboxilo-terminal de la cadena pesada del anticuerpo con grupos amino que se hayan añadido en la superficie del NM. Sin embargo, la existencia de otros dos grupos carboxilo terminal en las cadenas ligeras del anticuerpo, puede llevar a un enlace en el que el anticuerpo se posicione lateralmente, exponiendo de manera incorrecta el dominio de interacción con su receptor diana (Mahmoudi, 2018). De hecho, el posicionamiento incorrecto afecta a aproximadamente un 95% de los polipéptidos conjugados en la superficie de los NMs, disminuyendo significativamente las posibilidades de interacción con su diana (Herda *et al.*, 2017; Kelly *et al.*, 2015).

Como resultado de estos factores, menos de un 1% de las nanoterapias administradas llegan a su destino (Wilhelm *et al.*, 2016). En la búsqueda de alternativas que ofrezcan una mejora en todas estas cifras, en este trabajo, se propone una estrategia basada en la fusión de una secuencia catiónica conformada por residuos de histidina en uno de los extremos polipeptídicos (amino o carboxilo) de la proteína ligando de interés. El fin es conseguir un sistema universal que pueda aplicarse prácticamente a cualquier proteína ligando, que sirva como anclaje de manera orientada, estable y predecible

sobre la superficie de casi cualquier NM con carga superficial negativa, dejando expuesto el dominio de interacción correspondiente para la correcta interacción con su receptor o proteína diana.

3. Dianas terapéuticas alternativas: receptor Gb3 y toxina Shiga

3.1. Alteración del metabolismo de glicosfingolípidos en cáncer

Los glucoesfingolípidos son un subtipo de glucolípidos expresados en la superficie de todas las células animales, sintetizados por la adición de moléculas hidrofílicas de carbohidratos de cadena corta, a una cadena hidrofóbica de ceramida (esfingosina más un ácido graso). En función de sus cadenas de oligosacáridos, se pueden clasificar en gangliósidos, cerebrósidos y globósidos.

Los glucoesfingolípidos tienen papeles cruciales en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de las células, desde la estabilidad de la membrana plasmática, la regulación de numerosos procesos celulares (adhesión, proliferación, apoptosis y reconocimiento celular), así como en la modulación de diferentes vías de señalización celular, las cuales van a influir también en su estructura y función específica. Las diferentes células y tejidos muestran un patrón de expresión característico de glucoesfingolípidos; de hecho, se ha documentado en numerosos estudios la asociación de glucoesfingolípidos y/o enzimas relacionadas con el inicio y progreso del cáncer, resultando útiles como marcadores o dianas para diagnóstico y terapia (Zhuo *et al.*, 2018).

3.2. Globotriosilceramida (Gb3) y su relevancia en cáncer

La globotriosilceramida ($\text{Gal-}\alpha\text{1}\rightarrow\text{4Gal-}\beta\text{1}\rightarrow\text{4Glu-}\beta\text{1}\rightarrow\text{Cer}$), también denominada Gb3 o CD77, es un glucoesfingolípidos del grupo de los globósidos que se sintetiza por la adición de galactosa a la lactosilceramida en una reacción catalizada por la $\alpha\text{-1,4-galactosiltransferasa}$, y es metabolizada por la $\alpha\text{-galactosidasa}$, que hidroliza el enlace $\alpha\text{-terminal}$. Presenta una

expresión heterogénea a lo largo de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo humano, aunque el por qué no está del todo esclarecido. En tejidos normales, se ha encontrado expresión principalmente en células endoteliales y epiteliales de riñón, en intestino en la microvasculatura de la lámina propia, así como en las criptas con células inmaduras (Hoey *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2008), o en plaquetas. Estudios más recientes han demostrado su presencia en otros tejidos como el endotelio del sistema nervioso central o en neuronas, aunque su función concreta no se conoce bien. Además, es también el raro antígeno eritrocitario P^k del grupo sanguíneo P, y en el sistema inmune actúa como un antígeno de diferenciación linfocitaria expresado en el centro germinal B (Devenica *et al.*, 2011).

La glicosilación aberrante es común en la carcinogénesis, pudiendo alterar procesos celulares de señalización, crecimiento o motilidad. Numerosos tumores presentan alteraciones en la composición y metabolismo de glucoesfingolípidos, resultando en la aparición característica de éstos como antígenos asociados a tumores. Este es el caso de Gb3, cuya sobreexpresión se ha visto en diferentes tipos de cáncer: gástrico (Geyer *et al.*, 2016), colorrectal (Distler *et al.*, 2009; Falguieres *et al.*, 2008), cabeza y cuello (Bolot *et al.*, 1998; Filho *et al.*, 2015), páncreas (Distler *et al.*, 2009), vejiga (Heath-Engel & Lingwood, 2003), ovario (Arab *et al.*, 1997; Farkas-Himsley *et al.*, 1995), mama (Johansson *et al.*, 2009; LaCasse *et al.*, 1999; Stimmer *et al.*, 2014), así como en gliomas (Arab *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2006), meningiomas malignos (Salhia *et al.*, 2002) y leucemia no-linfocítica aguda (Cooling *et al.*, 2003). En algunos casos, existe incluso una correlación entre los niveles de Gb3 y la invasividad de las células tumorales con la formación de metástasis (Kovbasnjuk *et al.*, 2005).

3.3. Ligandos de Gb3: toxinas Shiga

El receptor Gb3 tiene como ligandos naturales la familia de toxinas Shiga (STx), que comprende una serie de exotoxinas bacterianas relacionadas entre sí por su estructura y función, producidas por el serotipo 1 de *Shigella dysenteriae* y por algunas cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* (cepas EHEC). La infección por estas toxinas en humanos se ha asociado al consumo de agua y alimentos contaminados, produciendo patologías como diarreas y colitis hemorrágicas y, en los casos más graves, síndrome urémico hemolítico, que conlleva síntomas como trombocitopenia, anemia hemolítica y fallo renal.

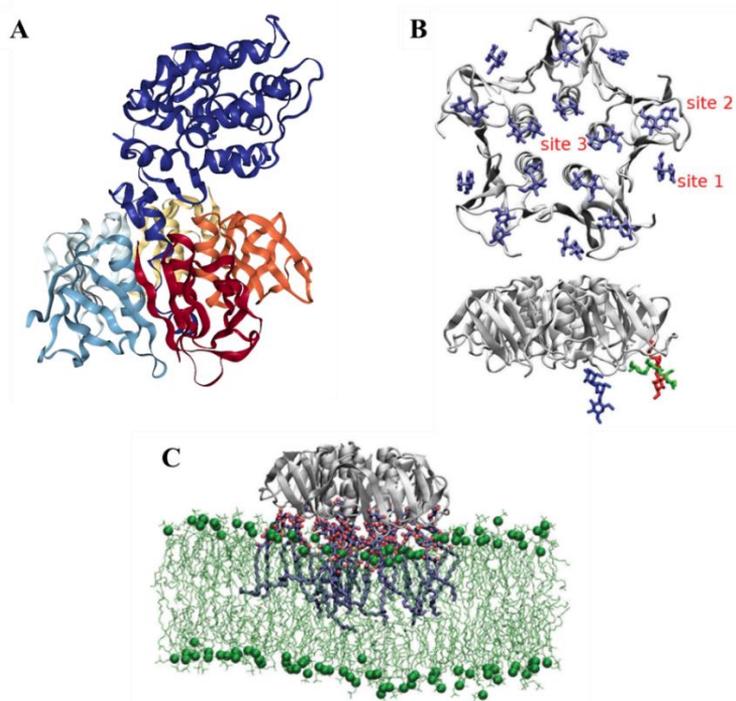


Figura 10. Estructura de la toxina Shiga. (A) Estructura tridimensional de la holotoxina. En azul oscuro aparece coloreada la subunidad A, y el resto de colores representan cada una de las 5 subunidades del homopentámero que conforma la subunidad B. (B) Sitios de unión a Gb3 presentes en la subunidad B; cada monómero presenta tres sitios de unión (representados en tres colores distintos en la imagen de abajo), habiendo un total de 15 sitios de unión en el homopentámero. (C) Representación del modelo de unión de STxB (mostrados en gris) a receptores Gb3 (en azul) en la membrana celular (bicapa lipídica en verde). Imágenes tomadas de las referencias (Melton-Celsa, 2014; Pezeshkian *et al.*, 2016).

Estas toxinas pertenecen al grupo de toxinas bacterianas con estructura denominada AB₅ (Beddoe *et al.*, 2010), al componerse de una subunidad A (STxA) monomérica de 32 kDa con actividad enzimática tóxica, asociada no covalentemente a una subunidad B (STxB) formada por cinco fragmentos B idénticos de 7.7 kDa cada uno, encargada de mediar la unión de la toxina a su receptor, Gb3. La elevada afinidad de STx por Gb3 se debe a la presencia de al menos dos y hasta tres dominios de unión por cada monómero de la subunidad B, con un total de hasta 15 dominios por STxB (Pezeshkian *et al.*, 2016).

La subunidad STxA posee una región sensible a tripsina, que permite que la subunidad se escinda de manera asimétrica en dos subunidades A₁ y A₂, que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La actividad enzimática de la toxina reside en A₁, mientras que A₂ consiste en una α -hélice que une A₁ con la subunidad STxB de unión al receptor, quedando insertada en el centro del homopentámero (Figura 10) (Melton-Celsa, 2014).

Existen diferentes variantes de las toxinas que, a pesar de compartir la misma estructura, difieren en su secuencia, en su afinidad por el receptor y en su patogenicidad. La variante producida por *Shigella*, denominada STx, fue la primera en ser descrita y el prototipo de la familia. En cuanto a las cepas de *E. coli*, pueden producir variantes STx1 y STx2, que son inmunológicamente diferentes y sólo comparten un 56% de la secuencia de aminoácidos entre sí, y que a su vez presentan sub-variantes (Johannes & Römer, 2010; Scheutz *et al.*, 2012). Entre las diferencias existentes entre los dos grupos, cabe destacar que a pesar de ser STx1 la de mayor afinidad por Gb3, STx2 ha demostrado ser hasta 400 veces más tóxica que STx1. Se ha visto cómo las variantes STx2 son causantes de los síntomas más graves como el síndrome urémico hemolítico o incluso síntomas neurológicos, mientras que las STx1 producen diarreas más leves sin complicaciones a nivel sistémico. Esta mayor toxicidad de STx2

Introducción

parece radicar en una mayor afinidad del fragmento STx2A₁ por los ribosomas, así como una mayor actividad catalítica (Basu *et al.*, 2016). Por otra parte, STx2 es más resistente a cambios de pH y temperatura. La variante STx2e por ejemplo tiene más afinidad por una variante del receptor, Gb4 (globotetraosilceramida), que contiene un residuo terminal β [1-3]-N-acetilgalactosamina adicional respecto a Gb3.

Existen diferentes variantes de las toxinas que, a pesar de compartir la misma estructura, difieren en su secuencia, en su afinidad por el receptor y en su patogenicidad. La variante producida por *Shigella*, denominada STx, fue la primera en ser descrita y el prototipo de la familia. En cuanto a las cepas de *E. coli*, pueden producir variantes STx1 y STx2, que son inmunológicamente diferentes y sólo comparten un 56% de la secuencia de aminoácidos entre sí, y que a su vez presentan sub-variantes (Johannes & Römer, 2010; Scheutz *et al.*, 2012). Entre las diferencias existentes entre los dos grupos, cabe destacar que a pesar de ser STx1 la de mayor afinidad por Gb3, STx2 ha demostrado ser hasta 400 veces más tóxica que STx1. Se ha visto cómo las variantes STx2 son causantes de los síntomas más graves como el síndrome urémico hemolítico o incluso síntomas neurológicos, mientras que las STx1 producen diarreas más leves sin complicaciones a nivel sistémico. Esta mayor toxicidad de STx2 parece radicar en una mayor afinidad del fragmento STx2A₁ por los ribosomas, así como una mayor actividad catalítica (Basu *et al.*, 2016). Por otra parte, STx2 es más resistente a cambios de pH y temperatura. La variante STx2e por ejemplo tiene más afinidad por una variante del receptor, Gb4 (globotetraosilceramida), que contiene un residuo terminal β [1-3]-N-acetilgalactosamina adicional respecto a Gb3.

3.3.1. Interacción STx con Gb3 y ruta intracelular

El receptor Gb3 se agrupa en regiones de la membrana conocidas como *lipid rafts* o balsas lipídicas, dominios conformados por el ensamblaje de esfingolípidos, colesterol y glicosilfosfatidilinositol. Esta asociación de Gb3

en balsas lipídicas es determinante para la posterior ruta intracelular de STx, ya que van a ser la organización y clasificación de los lípidos de membrana los que determinen la ruta intracelular (Melton-Celsa, 2014).

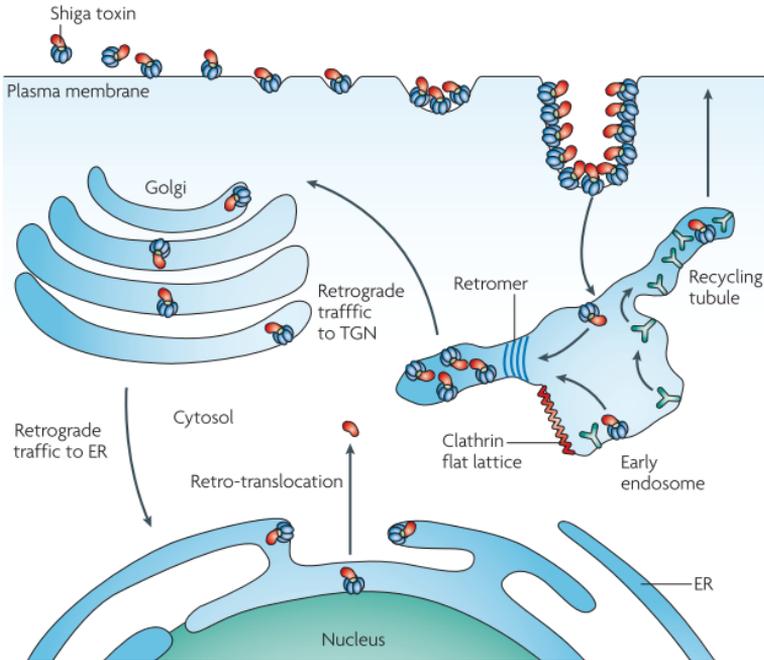


Figura 11. Mecanismo de entrada de la toxina Shiga. Tras interactuar con el receptor Gb3 en la membrana celular, se produce un reclutamiento de más receptores para poder unir más toxinas. Se produce entonces una invaginación de la membrana para la internalización de STx, pudiéndose producir un mecanismo específico de invaginación en forma tubular. Tras la entrada en la célula, se transporta vía endosomas tempranos o de reciclaje, para seguir una vía de transporte retrógrado hacia Golgi (red trans-Golgi), posteriormente retículo endoplásmico, orgánulo donde se produce la escisión de la subunidad A catalítica y su translocación al citosol, donde ejerce su actividad tóxica sobre el ARN ribosomal. Imagen tomada de la referencia (Johannes & Römer, 2010).

Tras la unión al receptor Gb3 en la membrana, STx es internalizada mediante endocitosis; se ha documentado que puede entrar tanto por vía dependiente como independiente de clatrina, en función del tipo celular. De hecho, STx puede inducir invaginaciones de membrana sin la ayuda de la maquinaria citosólica. En este caso, la toxina produce una curvatura en la membrana

Introducción

gracias al reclutamiento y agrupamiento de más moléculas de Gb3 en las balsas lipídicas, para dar lugar a estructuras tubulares que serán después procesadas mediante maquinarias implicando dinamina, actina y colesterol (Pezeshkian *et al.*, 2016; Römer *et al.*, 2007).

Tras ser endocitada, la toxina sigue una ruta retrógrada no-canónica, al no seguir la vía endo-lisosomal típica para la inmensa mayoría de proteínas o moléculas tras su interacción con receptores. Así, pasa desde los endosomas a la vía trans-Golgi, pudiendo hacerlo directamente mediante extensiones tubulares que emergen de los endosomas, o indirectamente mediante vesículas tipo endosoma que resultan del reciclaje de la membrana plasmática (Luginbuehl *et al.*, 2018). De Golgi continúa dirección retículo endoplásmico (RE), ruta que consigue realizar a pesar de no poseer ninguna secuencia KDEL en su estructura (secuencia de aminoácidos lisina-aspartico-glutámico-leucina que poseen aquellas proteínas con destino al RE). A nivel endosomal, la subunidad A sufre una rotura dando los fragmentos A₁ y A₂, que permanecen unidos por un puente disulfuro hasta que las condiciones reductoras del RE hacen que el fragmento A₁ se libere. Al estar desplegado, este fragmento es reconocido por las chaperonas del RE que hacen que, aprovechando el sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD), se retrotransloque del lumen del RE al citosol. Es entonces cuando A₁ ejerce su actividad enzimática N-glicosidasa y actúa eliminando una base de adenina del ARN ribosomal 28S de los ribosomas 60S, inhibiendo el proceso de síntesis de proteínas y desembocando finalmente en la muerte celular por apoptosis (Johannes & Römer, 2010; Melton-Celsa, 2014). La Figura 11 recoge un esquema con todo el mecanismo de entrada descrito.

3.3.2. Subunidad B de la toxina Shiga como ligando para dirigir agentes terapéuticos y de diagnóstico

Muchos de los nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer que se están desarrollando se basan en la conjugación de fármacos con anticuerpos o

fragmentos de éstos para su direccionamiento específico a receptores sobreexpresados en células tumorales, a los cuales son capaces de unirse con gran afinidad. Sin embargo, presentan ciertas desventajas como son su inestabilidad, su penetración limitada en tejidos debido a su gran tamaño (del orden de $14.5 \text{ nm} \times 8.5 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm}$) (Tan *et al.*, 2008), y su incapacidad de atravesar membranas celulares. Esto hace que las concentraciones que se alcanzan en el citosol no lleguen en muchos casos a las dosis necesarias para ejercer un efecto terapéutico.

Además, los anticuerpos son intrínsecamente activadores de la reacción del complemento, lo que hace que, con tan solo una molécula de anticuerpo en la superficie de una nanopartícula, el sistema inmune reconozca y elimine al nanomaterial (Moghimi *et al.*, 2011). En este contexto, toxinas como la Shiga ofrecen interesantes alternativas, ya que de manera natural han sido seleccionadas evolutivamente para unirse con una elevada afinidad a sus células diana. En el caso de la toxina Shiga, la ruta intracelular vía retrógrada, una vía no canónica de entrada en la célula, supone de nuevo una gran ventaja frente a otros ligandos, al evitar la ruta endo-lisosomal para invadir la células, evitando la exposición a medios ácidos y reductores lisosomales que a menudo destruyen los agentes terapéuticos (Luginbuehl *et al.*, 2018).

La estrategia más simple, y la hasta ahora empleada, de terapia dirigida a células tumorales que sobreexpresan Gb3, consiste en utilizar la toxina STx completa, incluyendo sus dos subunidades A y B. La inyección de ésta en tumores de diferente origen ha demostrado un efecto antineoplásico y antiangiogénico muy interesante (Luginbuehl *et al.*, 2018). Además, al utilizar un mecanismo de toxicidad independiente de los implicados en el desarrollo de resistencia a quimioterapias, pueden ser de gran utilidad precisamente para tratar células que ya sean resistentes a otros tratamientos. Es interesante por ejemplo que, células tumorales de pulmón resistentes a tratamientos

Introducción

convencionales como el cisplatino, sobreexpresan el receptor Gb3, haciéndolas mucho más sensibles a los efectos tóxicos de STx (Tyler *et al.*, 2015).

No obstante, el uso de la toxina completa incluyendo la subunidad STxA catalítica puede generar importantes efectos secundarios no deseados. Pero, dado que STxB no precisa de la subunidad STxA para interactuar con los receptores de membrana y ensamblar el homopentámero para unirse a su receptor, se presenta como un ligando muy interesante para dirigir nanoterapias o agentes de contraste de diagnóstico e identificación de células precancerosas positivas para Gb3 de forma inocua. Como ejemplos en el campo del diagnóstico, se han conjugado químicamente STxB con el fluoróforo FITC y el radionucleótido ^{18}F para el diagnóstico de tumores intestinales en ratón utilizando endoscopia confocal e imagen PET, permitiendo diferenciar células tumorales de sanas (Janssen *et al.*, 2006). En otro estudio, se comparó además el efecto de la vía de administración de STxB conjugada con el fluoróforo Cy5 en ratones con tumores de colon, obteniendo los mejores resultados de visualización tras la inyección intravenosa del conjugado (Tavitian *et al.*, 2008). También se ha visualizado con este mismo tipo de conjugado fluorescente, inyectado vía seno retro-orbital, carcinomas de mama así como metástasis a nódulos linfáticos asociadas (Stimmer *et al.*, 2014).

En cuanto a terapias, se han diseñado diversas estrategias. Por ejemplo, se ha conjugado STxB a fotosensibilizadores para realizar terapia fotodinámica. A pesar de aumentar hasta 10 veces la tasa de liberación en las células respecto a los fotosensibilizadores por separado, no se incrementó la fototoxicidad en el mismo grado, probablemente por la localización subcelular de los conjugados (se concentran en Golgi y RE, mientras que la toxicidad asociada a la terapia fotodinámica viene dada por las mitocondrias) (Amessou *et al.*, 2008; Tarragó-Trani *et al.*, 2006).

También se ha fusionado la subunidad STxB a diferentes compuestos y fármacos usados en quimioterapia para mejorar su direccionamiento y eficacia.

Por ejemplo, para el tratamiento de tumores de páncreas, se conjugó STxB con SN38, un metabolito del inhibidor de la topoisomerasa I irinotecan. Se vio que el efecto citotóxico en líneas celulares se veía aumentado más de 100 veces respecto al fármaco libre (Maak *et al.*, 2011). Este mismo conjugado dio resultados igual de prometedores en líneas celulares de tumores gástricos, mientras que en líneas sin expresión de Gb3 la toxicidad era mínima, demostrando la especificidad del sistema (Geyer *et al.*, 2016).

Con todos estos antecedentes, el estudio que se plantea en este trabajo empleará la subunidad STxB como ligando para dirigir nanomateriales de forma específica a células tumorales que sobreexpresen de Gb3, como elementos de diagnóstico y para el transporte de agentes terapéuticos. Concretamente, en esta Tesis se ha escogido estudiar su aplicabilidad como ligando para dirigir diferentes NMs a células tumorales de cáncer de CCC.

OBJETIVOS

➤ **Objetivo general.**

El objetivo general que persigue esta Tesis Doctoral es desarrollar nanopartículas multifuncionales y dirigidas de diferentes materiales, modificadas para su aplicación como agentes terapéuticos y de diagnóstico de precisión en cáncer de cabeza y cuello (CCC) como modelo de cáncer tratable tópicamente.

➤ **Objetivos específicos.**

Los objetivos concretos que se han propuesto para alcanzar el objetivo final de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Diseño, síntesis y modificación de nanopartículas fluorescentes, biocompatibles y fotoactivables de óxido de hierro y oro con una cubierta de sílice.
2. Diseño, producción y purificación de una proteína ligando para biofuncionalizar y direccionar las NPs a receptores del cáncer, basada en el dominio B de la toxina de la Shiga.
3. Estudio de la interacción selectiva y del mecanismo de entrada de los nanomateriales funcionalizados con la proteína ligando en células tumorales de CCC.
4. Evaluación del efecto terapéutico inducido por fototermia a partir de los NMs internalizados en células tumorales de CCC tras la aplicación de un láser NIR de 808 nm.
5. Diseño de nanotermómetros basados en recubrimientos con óxidos dopados con tierras raras trivalentes (Er^{3+}) para la determinación *in situ* de la temperatura alcanzada por los NMs durante el proceso de hipertermia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Síntesis de nanomateriales

1.1. Nanorods de oro

Las síntesis descritas en este apartado se realizaron durante la estancia en el CIC biomaGUNE (San Sebastián), bajo la supervisión del Dr. Luis M. Liz-Marzán dentro del grupo de Bionanoplasmónica y la plataforma de Síntesis Coloidal con la Dra. Ana Sánchez Iglesias.

1.1.1. Procedencia de los reactivos utilizados

Los siguientes reactivos y precursores se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), ácido cloroáurico (HAuCl_4), borohidruro de sodio (NaBH_4), ácido 5-bromosalicílico (5-BrSA), nitrato de plata (AgNO_3), ácido ascórbico, *O*-[2-(3-Mercaptopropionylamino)ethyl]-*O'*-methylpolyethylene glicol (mPEG-SH, P_M 5000, Ref. 11124), solución de hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30%), tetraetilortosilicato (TEOS, 98%), isotiocianato de rodamina B (RBITC, 70% eficiencia de tinción), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APMS, 97%). El etanol (puro) utilizado fue de Scharlab. El agua utilizada para todos los pasos de este apartado fue agua Milli-Q (resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

1.1.2. Síntesis de nanorods de oro

Para la síntesis de *nanorods* de oro (AuNRs) se siguió el método basado en el uso del ácido 5-bromosalicílico (5-BrSA) como aditivo en la reacción (Figura 12) (Scarabelli *et al.*, 2013). Este método de síntesis conlleva la síntesis de “semillas” (núcleos) de oro (i), una fase de pre-reducción (ii) y una fase de crecimiento de los AuNRs (iii), detalladas a continuación.

i) Síntesis de las semillas

En primer lugar, se sintetizaron las semillas de oro, pequeñas NPs que sirven de nucleación para la posterior formación de los AuNRs en una fase de crecimiento. Para ello, se añadieron 25 μl de una solución de HAuCl_4 50 mM a 4.7 ml de CTAB 0.1 M. Tras 5 minutos en agitación suave, asegurando que

no hay signos de turbidez, se añadieron muy rápidamente y con agitación fuerte (>1000 rpm) 300 μ l de una solución recién preparada de NaBH_4 10 mM. Tras unos segundos de agitación, la reacción se dejó un mínimo de 30 minutos para que terminase de descomponerse el exceso de NaBH_4 . Todo el proceso descrito tiene lugar a una temperatura de 27-30 $^\circ\text{C}$, evitando tanto temperaturas más bajas para que el CTAB no cristalice como más altas para que la semilla no crezca más en tamaño, lo cual conduciría a mayor polidispersidad de tamaños en la muestra y a la aparición de poblaciones secundarias. Las semillas sintetizadas se almacenaron también a la mencionada temperatura y se utilizaron para el crecimiento de los AuNRs en el mismo día, puesto que su estabilidad es muy reducida.

ii) Fase de pre-reducción

Con este método se realiza una pre-reducción de Au(III) a Au(I) con 5-BrSA. Se añadieron 45 mg de 5-BrSA a 50 ml de una solución de CTAB 0.05 M. Una vez disuelto por completo con ayuda de sonicación, se añadieron bajo agitación suave 480 μ l de AgNO_3 . Después de 15 min, se añadieron 500 μ l de HAuCl_4 50 mM, momento en el que comienza la reducción del Au(III) a Au(I). Para monitorizar el grado de reducción, se midió el espectro UV-vis. El complejo $[\text{AuBr}_4]^-$ es naranja con absorción máxima en 396 nm, mientras que el complejo $[\text{AuBr}_2]^-$ es incoloro; de esta forma, a medida que se reduce más oro, menor es la absorbancia a 396 nm. Controlando la pre-reducción es posible regular el ratio de los AuNRs: a mayor reducción del Au (menor absorbancia), menor ratio. De manera orientativa, una absorbancia a 396 de $\text{Abs}_{396} = 0.8-0.85$ genera AuNRs con plasmón longitudinal en torno a 800 nm.

iii) Fase de crecimiento

Una vez alcanzado el valor de absorbancia deseado (en torno a 0.85), se aumentó la velocidad de agitación de la mezcla a unas 1000 rpm y se añadieron 130 μ l de ácido ascórbico 100 mM, volviéndose transparente la solución. Tras

agitar 30 segundos, se añadieron 80 μl de la solución de semillas, y tras otros 30 segundos de agitación, se dejó reaccionar ya sin agitación durante un mínimo de 4 h. Para eliminar el Au(I) que ha quedado sin reaccionar, se centrifugó la suspensión a 9500 rpm y se redispersó en agua.

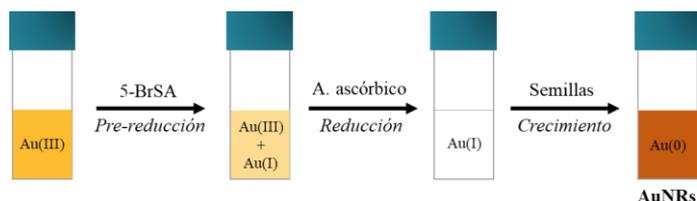


Figura 12. Esquema resumen del proceso de síntesis de AuNRs. El método utilizado conlleva una fase de pre-reducción parcial de Au(III) a Au(I) por la adición de ácido salicílico, proceso que va a permitir controlar el tamaño final de los AuNRs. Tras la adición del ácido ascórbico, el Au pasa a reducirse por completo a Au(I). Finalmente, la adición de las semillas previamente sintetizadas permite la formación de AuNRs.

1.1.3. Recubrimiento de sílice fluorescente

Para el recubrimiento de los AuNRs con sílice amorfa, se utilizó un método basado en la estabilización previa de los NRs con PEG (Figura 13) (Fernández-López *et al.*, 2009). Dado que uno de los pocos grupos por los que tiene afinidad el oro es el azufre, se utilizó un PEG modificado con un grupo tiol en uno de sus extremos. Siguiendo este método de síntesis, en primer lugar, se lavó el exceso de CTAB de la solución de AuNRs; se centrifugaron 20 ml de la solución a 8000 rpm durante 20 min, se redispersó el sobrenadante en agua milli-Q y se hicieron dos lavados más, centrifugando esta vez a 6000 rpm y resuspendiendo en una solución de agua con CTAB 1 mM para asegurar la estabilidad de los AuNRs. Tras el último lavado, se resuspendió en un volumen de 7 ml. Se añadieron 3 ml gota a gota de una solución acuosa de mPEG-SH, previamente sonicada en baño durante 5 min para su homogenización, que contenía $1.06 \cdot 10^{-6}$ moles, de manera que se añadieron aproximadamente 50 moléculas/nm². Tras 1 hora en agitación, se lavó dos veces la reacción para eliminar el exceso de mPEG-SH, y finalmente se redispersó en 2 ml de etanol.

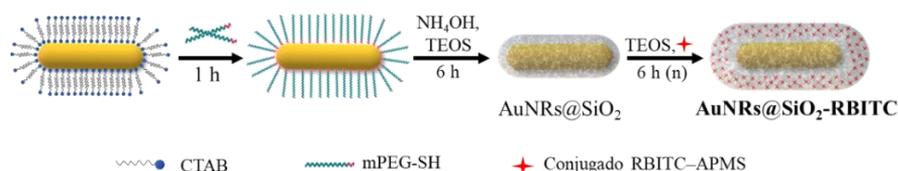


Figura 13. Esquema del recubrimiento de AuNRs con SiO₂ fluorescente. Tras la sustitución del surfactante CTAB por mPEG-SH, los AuNRs pueden transferirse al medio necesario para el recubrimiento con SiO₂. Tras un primer recubrimiento, se realizaron sucesivas adiciones de TEOS para el crecimiento de la capa, incorporando en este caso además el fluoróforo RBITC previamente conjugado de manera covalente con APMS.

Para el recubrimiento con sílice, se preparó una mezcla de reacción con los AuNRs recubiertos de mPEG-SH ([Au] = 0.5 mM), H₂O (10.55 M), y NH₃ (0.2 M) ajustando el volumen final con etanol. Tras comprobar que el pH se encontrase entre 8 y 10, se añadió gota a gota una disolución de TEOS diluido en etanol (10% v/v) para una concentración final de 1 mM. Se dejó reaccionar 6 horas en agitación a temperatura ambiente. Para aumentar el grosor de la capa de SiO₂, se realizaron sucesivas adiciones de cantidades crecientes de TEOS, incorporando en estas adiciones además el conjugado RBITC-APMS (~1 molécula/nm²). Finalmente, para eliminar el exceso de reactivos se centrifugó y lavó con etanol tres ciclos de 20 min a 8000 rpm, para conservar finalmente en etanol.

1.2. Nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄)

La síntesis y recubrimiento de estas NPs se realizaron durante la estancia en el *International Iberian Nanotechnology Laboratory* (INL) de Braga (Portugal), bajo la supervisión del Dr. Manuel Bañobre López dentro del grupo de Nanomedicina.

1.2.1. Procedencia de los reactivos utilizados

Los siguientes reactivos se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich: cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 99%), cloruro de hierro (II) tetrahidratado (FeCl₂·4H₂O, 99%), oleato sódico (82%), isotiocianato de

rodamina B (RBITC, 70% labelling efficiency), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APMS, 97%), tetraetilortosilicato (TEOS, 98%), y solución de hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30%). El ciclohexano (99.5%) y el alcohol isopropílico utilizados fueron adquiridos a PanReac AppliChem, y el etanol (96%) a Scharlab.

1.2.2. Síntesis de nanopartículas de magnetita

Para la síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) dispersables en medio orgánico, requisito necesario para el posterior recubrimiento de sílice, se siguió un método de síntesis hidrotermal (Figura 14) (Kolen'ko *et al.*, 2014). Se disolvieron 8 mmol (1.59 g) de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 14 mmol (3.78 g) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 7 ml de agua, que se añadieron a un vaso de politetrafluoroetileno (PTFE) para autoclave de 40 ml. En paralelo, 1.64 mmol (0.499 g) de oleato sódico (82%) se disolvieron en 5 ml de agua a 60 °C. Una vez completamente disuelto, esta solución se añadió a la de las sales de Fe, y a continuación se añadieron 15 ml de NH_4OH . Tras cerrar el vaso de PTFE, meterlo en el autoclave y sellarlo, se dejó la reacción a 200 °C durante 24 horas.

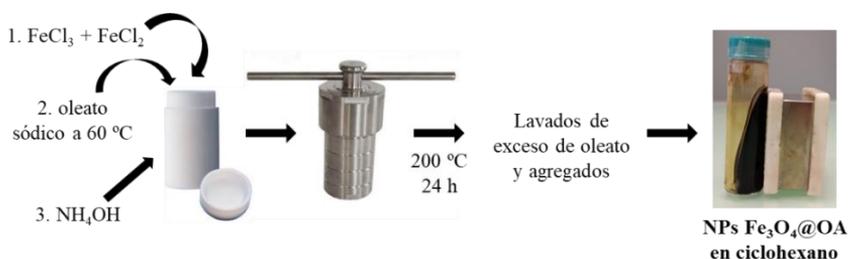


Figura 14. Esquema resumen del proceso de síntesis de NPs de Fe_3O_4 por método hidrotermal. Tras la síntesis se obtiene un ferrofluido estable en medios orgánicos gracias al recubrimiento con grupos oleato.

El producto obtenido se recogió por decantación, se lavó primero con agua 4-5 veces con la ayuda de un imán y redispersando con ultrasonidos. Tras los lavados con agua, las NPs se dejaron secar 24 h en vacío a temperatura ambiente. Se resuspendieron entonces en ciclohexano, y se centrifugaron 10

min a 3000 rpm para quitar sólidos insolubles. Para lavar el exceso de oleato, se añadió etanol y se centrifugó 10 min a 6000 rpm, resuspendiendo en ciclohexano. Este protocolo de lavado se repitió dos veces más, y finalmente las NPs se resuspendieron en ciclohexano para su conservación.

1.2.3. Recubrimiento de sílice fluorescente

En el método de recubrimiento por microemulsión inversa (ver Figura 15), un surfactante, en este caso Igepal CO-520, se disolvió en un medio orgánico (ciclohexano) para formar lo que se conoce como “micelas inversas”, en las que los grupos apolares de las moléculas de surfactante quedan orientadas al exterior, hacia la fase orgánica, quedando los grupos polares orientados al interior acuoso de la micela. De esta forma, es en este núcleo polar de la micela donde queda confinada la parte acuosa con el precursor de la sílice (TEOS) y el agente hidrolizante (amoníaco). Al hidrolizarse y depositarse la capa de sílice sobre la NP de manera confinada, se trata de un método que ofrece más control que el procedimiento clásico de Stöber (Stöber *et al.*, 1968).

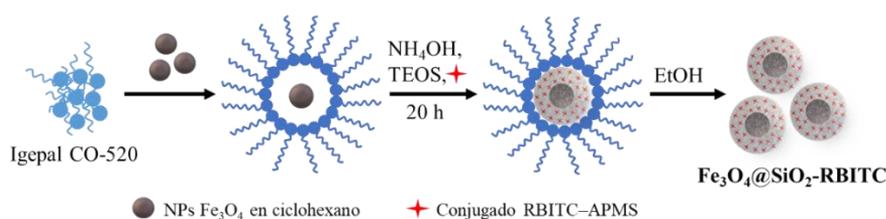


Figura 15. Esquema del recubrimiento de NPs de Fe_3O_4 con SiO_2 fluorescente. El método utilizado, una microemulsión inversa, permite recubrir NPs en medios orgánicos con una capa de sílice, incorporando además en ésta el fluoróforo RBITC mediante conjugación covalente a través del APMS.

La síntesis se realizó en viales de vidrio de 22 ml con tapón de PTFE. Primero se pesó el Igepal CO-520 (0.4784 g). A continuación, se añadieron en el siguiente orden: ciclohexano (8.73 ml), NPs de Fe_3O_4 en ciclohexano (270 μl de una solución a 7 mg/ml), NH_4OH (70 μl) y, finalmente, el TEOS (150 μl). Entre cada adición la disolución se mezcló con la ayuda de vórtex y baño de

ultrasonidos dos minutos. Una vez añadido todo, se sellaron bien los viales, se cubrieron de papel de aluminio y se dejaron reaccionar en oscuridad durante 20 h. Pasado este tiempo, para parar la microemulsión, se añadieron al vial 6 ml de etanol y se agitó para mezclar todo bien. El etanol hace que las micelas se rompan y las NPs caigan en la fase alcohólica. Para lavar, se centrifugó primero a 3000 rpm durante 5 min, se resuspendió en etanol sonicando, y se volvió a centrifugar, esta vez 10 min a 8000 rpm. Este proceso se repitió 3 veces para finalmente conservar las NPs en etanol.

1.3. Partículas de sílice

Aunque los principales nanomateriales con los que se ha trabajado en esta tesis son los descritos en los anteriores apartados, oro y magnetita, para algunas pruebas de concepto se trabajó con partículas de SiO₂ amorfas de ~500 nm de diámetro, ya que su tamaño facilita su visualización en técnicas como la microscopía confocal de fluorescencia. Estas partículas fueron sintetizadas y proporcionadas por la Dra. Eloísa González Lavado, de nuestro grupo de investigación. Para su síntesis, se siguió un método de Stöber modificado (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2017). Una solución de TEOS (1.7 ml, 98%) se añadió a una solución que contenía hidróxido de amonio (1.97 ml), agua (3.1 ml) y etanol (18.2 ml), y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo, el exceso de reactivos se eliminó mediante tres ciclos de centrifugación-redispersión con etanol (9000 rpm, 10 min).

1.4. Recubrimiento de Y₂O₃:2%Er³⁺

En primer lugar, se sintetizaron partículas de Fe₃O₄ recubiertas de SiO₂ siguiendo el mismo protocolo descrito en el Apartado 1.2.3., omitiendo únicamente la adición del conjugado del fluoróforo RBITC. A continuación, se siguió un método de precipitación con urea para la formación de una capa de Y₂O₃ dopada con un 2% mol de Er³⁺ (Figura 16) (F. Zhang *et al.*, 2010). En

Material y métodos

primer lugar, se dispersaron 10 mg de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en 100 ml de agua con ayuda de sonicación en baño (15 min). Se añadieron 0.2 mmol (76.6 mg) de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.9%, Alfa Aesar), $1.95 \cdot 10^{-3}$ mmol (0.87 mg) de $\text{Er}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.9%, Alfa Aesar), y 17.98 mmol (1.08 g) de urea (Sigma-Aldrich). La solución se homogeneizó con el baño de ultrasonidos durante 20 min, y posteriormente se calentó a 90 °C con reflujo durante 2 h. Pasado el tiempo de reacción, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente para después centrifugar el precipitado sólido formado (5 min a 5000 rpm) y realizar sucesivos lavados con etanol. El producto final se dispersó en etanol (5 ml), se dejó secar toda la noche a 60 °C y finalmente se calcinó a 700 °C durante 3 h con una rampa de calentamiento de 2 °C/min.

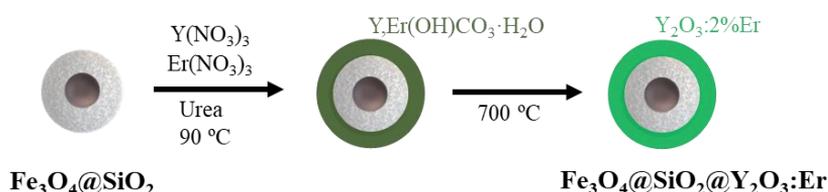


Figura 16. Esquema del recubrimiento de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con una capa de Y_2O_3 dopada con un 2% de Er^{3+} . Tras la reacción de precipitación con urea y los nitratos precursores de ytrio y erbio, se forma un producto intermedio que, tras un tratamiento térmico, permite obtener la capa final de $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$.

Para tener una comparativa del comportamiento del material cuando forma parte de un recubrimiento respecto a cuando forma una nanopartícula por sí mismo, se sintetizaron en paralelo NPs de Y_2O_3 impurificadas también con un 2% de Er^{3+} . Adaptando un protocolo ya descrito (Geitenbeek *et al.*, 2019), se disolvieron 1.426 mmol (546.16 mg) de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ y $1.39 \cdot 10^{-2}$ mmol (6.19 mg) de $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$ en 2 ml de H_2O . Esta solución se añadió a una solución previamente preparada y bien homogeneizada de urea (50 g, 0.825 mol) en agua (200 ml). La solución resultante se calentó a 85 °C durante 2 h. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente para

centrifugar el precipitado sólido formado (5000 rpm, 5 min) y realizar sucesivos lavados con agua. El producto se dispersó en etanol (50 ml), se dejó secar toda la noche a 60 °C y finalmente se calcinó a 800 °C durante 3 h con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. El rendimiento de la reacción fue del 87%.

1.5. Caracterización de los nanomateriales

1.5.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la caracterización morfológica y de tamaño de los materiales sintetizados, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, diluciones de los diferentes NMs se montaron y dejaron secar sobre rejillas de cobre con recubrimiento de carbono, de malla 400 (EM Resolutions). Los microscopios utilizados para el análisis 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 Valdecilla – IDIVAL; por otro lado, los AuNRs fueron sintetizadas y caracterizadas durante la estancia en el CIC biomaGUNE mediante un JEOL JEM-1400PLUS equipado con una cámara CCD GATAN US1000.

1.5.2. Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X (XRD) se analizaron usando radiación Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a un voltaje de 40 kV e intensidad de 25 mA, en el difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance ubicado en los laboratorios DCITIMAC de la Universidad de Cantabria. Los diagramas de difracción se obtuvieron como una función de 2θ en el rango 10°-135° con un paso de 0.05°. Se utilizaron los programas MAUD y TOPAS para el refinamiento de los datos empleando el método Rietveld. Estas medidas de XRD se utilizaron para comprobar la pureza de la fase cristalina de las NPs de óxido de hierro, así como para estimar el tamaño de los nanocristales.

1.5.3. Medidas de potencial ζ

El término potencial ζ hace referencia a la medida de la magnitud de repulsión o atracción entre partículas en un sistema coloidal o suspensión coloidal. Viene dado por la intensidad del campo eléctrico superficial de un nanomaterial en un sistema físico-químico compuesto por dos fases: una continua, una solución fluida o líquida, y otra dispersa en forma de material en estado sólido. Se considera que un valor de potencial ζ a partir de -30 mV o +30 mV es suficiente para que las fuerzas de repulsión superen a las de atracción y, por tanto, el sistema coloidal sea estable. Además de una medida de estabilidad, conocer el valor de la carga superficial de un nanomaterial va a permitir determinar las posibles funcionalizaciones, fundamentalmente de carácter electrostático, que se puedan llevar a cabo. Para la determinación del potencial ζ de los diferentes NMs sintetizados, se midieron suspensiones de dichos NMs en agua destilada en un equipo Zetasizer Nano (Malvern Panalytical).

1.5.4. Espectroscopía UV-visible

El espectro de absorción representa la absorbancia frente a la longitud de onda de la radiación incidente. Ya que parte de la energía absorbida por las NPs es transformada en calor, el valor de la longitud de onda de absorción va a indicar con qué longitudes de onda de un láser van a calentarse las NPs, determinante de cara a su uso como terapia fototérmica.

En el caso de los NMs, el análisis de su espectro de absorción UV-vis-NIR es especialmente importante. Gracias a este espectro, se puede determinar la longitud de onda de resonancia del plasmón de superficie en el caso de los NMs de oro, que depende principalmente de su tamaño y forma. Tras recubrir con SiO₂, la longitud de onda del plasmón se desplaza a longitudes de onda mayores, permitiendo monitorizar la formación de la capa y el aumento de su grosor durante la reacción de síntesis. Con el espectro de absorción UV-vis-NIR, también es posible obtener una idea del grado de dispersión de tamaños de la muestra a través de la anchura del pico de absorción, siendo más estrecho

a mayor monodispersidad (Scarabelli *et al.*, 2015). Finalmente, también puede analizarse la concentración de la muestra a partir del espectro de absorción; en el caso de los NMs de oro, se puede relacionar el valor de absorbancia a 400 nm con la concentración de Au de la muestra (Hendel *et al.*, 2014).

El equipo utilizado para la medida de los espectros UV-vis-NIR fue un Cary 6000i equipado con una esfera integradora, ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cantabria. Durante la estancia en el CIC biomaGUNE, el equipo empleado para monitorizar los espectros de los AuNRs sintetizados fue un espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilent).

1.5.5. Espectroscopía de fluorescencia

La fotoluminiscencia y espectros de excitación y emisión de las diferentes muestras de NMs se midieron usando un espectrómetro de fluorescencia FLSP920 (Edinburgh Inst.) ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cantabria, equipado con fotomultiplicadores para el rango espectral 200 – 1100 nm y un detector de estado sólido InGaAs (800-1700 nm), una lámpara continua de Xenón de 450 W y monocromadores dobles para excitación y emisión. Para el caso de las muestras de NPs que contienen en su recubrimiento el fluoróforo RBITC, las longitudes de onda para los espectros de excitación y emisión fueron $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm, respectivamente.

1.5.6. Medidas magnéticas

Para estudiar las propiedades magnéticas de las NPs de Fe₃O₄ y el efecto en éstas del recubrimiento con sílice, se realizaron las medidas de susceptibilidad magnética y magnetización en muestras en polvo (10-15 mg) en un magnetómetro SQUID Quantum Design MPMS. Los ciclos de histéresis se obtuvieron a temperatura ambiente (300 K) hasta un campo $H = 50$ kOe, para evaluar los parámetros magnéticos de campo coercitivo (H_C) y magnetización de saturación (M_S). También se midieron las curvas de susceptibilidad magnética ZFC (*zero field cooling*) y FC (*field cooling*). Para ello, las muestras

fueron primero enfriadas de RT a 4 K en ausencia de campo magnético (ZFC). Tras enfriar, se aplicó un campo magnético de $H = 50$ Oe, y la temperatura se incrementó hasta 300 K mientras se medía la magnetización en función de la temperatura. Después, las muestras se volvieron a enfriar a 4 K con el campo magnético aplicado (FC), y de nuevo se recogió la magnetización en función de la temperatura mientras ésta se incrementaba hasta 300 K.

1.5.7. Calibrado de la emisión en función de la temperatura de las NPs con $Y_2O_3:2\% Er^{3+}$

Una muestra en polvo de las NPs sintetizadas de $Fe_3O_4@SiO_2@Y_2O_3:2\%$ mol Er^{3+} se colocó sobre un sustrato metálico en la platina calefactora (Linkam TS100) acoplada al microscopio confocal de un espectrómetro T64000 (HORIBA Scientific) que emplea como fuente de excitación un láser de Ar^+-Kr^+ sintonizado en la línea de 514.5 nm. Se midieron los espectros de emisión cada 2.5 °C entre 22 y 70 °C, esperando un mínimo de 2 min tras variar la temperatura para asegurar la estabilidad térmica.

1.6. Soluciones empleadas en el estudio de la estabilidad del recubrimiento de SiO_2 en medios fisiológicos

Para tener idea de la estabilidad y posible degradación de la capa de SiO_2 de las NMs sintetizados en un entorno fisiológico, se incubaron NPs de $Fe_3O_4@SiO_2-RBITC$ a una concentración de 100 $\mu g/ml$ en tres medios diferentes: (a) PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4), (b) medio de cultivo DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero, y (c) un medio lisosomal sintético (25 mM MES-NaOH pH 4.5 que contiene 0.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, and 200 mM KCl) (H. Müller *et al.*, 2010). Todas las sales utilizadas para la preparación de los medios se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las muestras se incubaron a 37 °C en agitación suave con noria, y se tomaron alícuotas de 200 μl de cada medio de incubación cada 24 h hasta un periodo total de una semana. Estas alícuotas se centrifugaron durante 20 min a 10000 rpm y se lavaron tres

veces con agua destilada. Finalmente, las muestras se resuspendieron y montaron en rejillas de TEM (ver sección 1.4.1) para analizar la morfología de las NPs resultantes.

2. Proteínas recombinantes

2.1. Diseño de la construcción de la proteína fluorescente verde (6xHis:GFP)

La proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) es una proteína con estructura de β -barril de ~ 27 kDa en cuyo interior se encuentra protegido el cromóforo que le da su característica fluorescencia verde endógena. Fue descubierta en la medusa *Aequorea victoria* hace más de 50 años, valiéndole a sus descubridores el Premio Nobel de Química en 2008 (Shimomura, 2005; Shimomura *et al.*, 1962). Desde entonces se ha utilizado en innumerables aplicaciones en biología molecular y celular como proteína reportera para marcar proteínas, compartimentos subcelulares, células y regiones de tejido específicas. Se han desarrollado diversas variantes de la misma mediante mutaciones genéticas, dando lugar a proteínas optimizadas que presentan emisión a diferentes longitudes de onda. Un caso de estas variantes es EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), versión de la proteína original desarrollada inicialmente por *Clontech Laboratories*, con una estabilidad y emisión fluorescente mejoradas (G. Zhang *et al.*, 1996). En esta memoria, se ha trabajado con esta versión (aunque para simplificar la nomenclatura se refiera a ella como GFP) fusionada a una secuencia de 6 residuos de histidina en su extremo N-terminal, construcción denominada de aquí en adelante 6xHis:GFP (ver Figura 17). Con esta construcción, como se verá en los próximos apartados, se llevó a cabo el estudio de la utilidad de la secuencia de histidinas como estructura de unión a la superficie de partículas de SiO₂, así como las evaluaciones de la estabilidad de la unión ante diferentes condiciones.

Material es y métodos

La secuencia de ADN de esta proteína recombinante, recogida en la referencia AAO20041.1 de *GenBank* (NCBI), es la siguiente:

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATC
CTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACC
CTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC
CCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA
ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG
TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAAC
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTG
CTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAA
GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

Para nuestro estudio se generó una proteína de fusión con 6 residuos de histidina en el extremo amino terminal de la GFP. A continuación, se muestra la secuencia de la proteína completa, con los residuos de histidina resaltados en azul y los de la GFP en verde:

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGTLELKLRLKILQSTVPRARDPPVATM
VSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFI
CTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV
QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL
EYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI
GDGPVLLPDNH YLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMD
ELYK
```

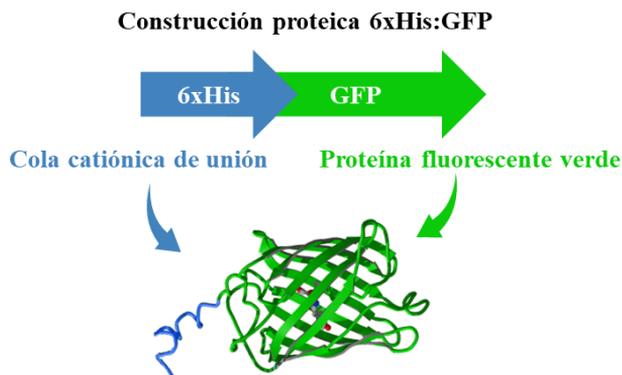


Figura 17. Estructura de la proteína recombinante 6xHis:GFP. Se ha fusionado una secuencia de 6 residuos de histidina en el extremo amino-terminal de la GFP.

La secuencia génica indicada se sintetizó y clonó por la compañía *General Biosystems* (Morrisville, USA). La construcción génica resultante fue secuenciada para su comprobación.

La secuencia genética está clonada en el vector pET-15b (Novagen). En dicho vector, los genes clonados están bajo el control de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, una polimerasa altamente específica por la acción de su promotor *lac*, de manera que la transcripción de los genes de interés sólo va a tener lugar tras la adición del correspondiente inductor. En el caso del promotor *lac*, se puede inducir por el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la alolactosa. En ausencia de inductor, gracias a la presencia de la secuencia *lacI* que codifica la proteína represora LacI, ésta impide que la ARN polimerasa transcriba los genes, de manera que el sistema permanece inactivo para el ahorro energético de la bacteria. El vector pET-15b también presenta un gen de resistencia a ampicilina, permitiendo una posterior selección de las bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido de interés.

Con este plásmido que contiene la secuencia, se transformaron bacterias químicamente competentes One Shot™ BL21(DE3)pLysS *E. coli* (Thermo

Fisher). El plásmido pLysS se caracteriza por la producción de la lisozima T7 para reducir la expresión basal del gen de interés, y además confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol. Siguiendo el protocolo de transformación proporcionado por la citada compañía, se descongeló en hielo un vial de 50 µl de bacterias competentes a las que se añadió 1 µl de DNA de 6xHis:GFP (10 ng), y tras mezclar suavemente, se dejó incubando en hielo durante 30 min. Se calentó entonces en baño a 42 °C durante 30 segundos, volviéndolo a poner rápidamente en hielo. Se añadió al tubo 250 µl de medio SOC (*Super Optimal Broth*) precalentado y se dejó crecer a 37 °C en agitación a unas 225 rpm durante 1 hora. A continuación, se sembraron dos volúmenes distintos del cultivo (20 µl y 200 µl) en dos placas con LB agar (Labkem) con ampicilina (100 µg/ml; Scharlau) y cloranfenicol (34 µg/ml; Fisher Scientific), y se dejaron incubando a 37 °C durante toda la noche para el crecimiento de las colonias bacterianas.

2.2. Síntesis, clonación y transformación de STxB:6His

Para la producción de una proteína recombinante consistente en la subunidad B de la toxina Shiga con una secuencia de 6 histidinas, construcción denominada STxB:6xHis, se diseñó una construcción de ADN partiendo de la secuencia de la subunidad B de la toxina Shiga 2 recogida en la referencia NC_002695.1 de *GenBank* (NCBI). A esta secuencia se le añadió otra codificante para seis residuos de histidinas en su extremo 3', resultando en la siguiente construcción genética:

```
ATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGCTTCTGTTA
ATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCA
AGTATAATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAG
AATACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGCAACCGTTACTGCAAAGTG
CTCAGTTGACAGGAATGACTGTCAACAATCAAATCCAGTACCTGTG
```

AATCAGGCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACCATC
ATCACCATCACCATTGA

La secuencia de aminoácidos resultado de la transcripción y traducción del ADN sería así la siguiente:

MKKMFMAVLFALASVNAMAADCAKKGKIEFSKYNEDDTFTVKVDGK
EYWTSRWNLQPLLQSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFNNDHH
HHHH

Esta construcción fue sintetizada y clonada en el vector pET-15b (Novagen) por la empresa *General Biosystems*. Al igual que en el caso de la 6xHis:GFP, al tratarse del mismo vector, la expresión de STxB:6xHis va a producirse tras la inducción por IPTG, y la selección de bacterias transformadas se puede realizar mediante la adición de ampicilina gracias al correspondiente gen de resistencia. El liofilizado proporcionado por *General Biosystems*, 5 µg, fue reconstituido en 50 µl de H₂O destilada desionizada para poder proceder a su transformación en las células químicamente competentes One Shot™ BL21(DE3)pLysS *E. coli*, siguiendo el mismo protocolo descrito en el anterior apartado para 6xHis:GFP.

2.3. Sobreexpresión de 6xHis:GFP y STxB:6xHis

Para llevar a cabo la sobreexpresión de las proteínas recombinantes, se inoculó una colonia aislada de las placas con las bacterias BL21(DE3)pLysS transformadas con los plásmidos correspondientes, bien a la construcción de 6xHis:GFP o de STxB:6xHis, en 20 ml de medio de cultivo nutritivo LB (Labkem) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Tras dejar el preinóculo creciendo toda la noche, se realizó una dilución 1:100 del preinóculo a un volumen mayor de LB con ampicilina (100 µg/ml) para la posterior inducción de la expresión de la proteína de interés. Una vez hecha esta dilución, se dejó crecer el cultivo a 37 °C hasta que su densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) alcanzase un valor entre 0.5-0.6, dato

indicativo de que las bacterias están en su fase exponencial de crecimiento y es, por tanto, el momento óptimo para inducir la expresión de la proteína. Para la inducción, en el caso de la 6xHis:GFP, se añadió al cultivo bacteriano IPTG (PanReac AppliChem) a una concentración de 0.7 mM y se dejó incubando a 37 °C durante 4 h. Para la STxB:6xHis, se añadió IPTG a una concentración de 0.1 mM y se incubó 15 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo correspondiente de inducción, se centrifugó el cultivo bacteriano a 4200 rpm durante 30 min, se descartó el sobrenadante y los pellets bacterianos se guardaron a -80 °C hasta su uso, o en hielo si se procedió inmediatamente después a la lisis.

2.4. Lisis bacteriana y extracción de proteínas

Para lisar las bacterias y obtener la fracción soluble de proteínas, entre las que estará la proteína 6xHis:GFP o STxB:6xHis sobreexpresada, se realizó una digestión enzimática de la pared bacteriana con lisozima, seguida de una lisis mecánica por ultrasonidos para complementar la rotura. Así, los pellets de bacterias se resuspendieron en tampón de lisis LEW (tampón de lisis-equilibrado-lavado) (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8) suplementado con 1 mg/ml de lisozima (PanReac AppliChem, 22500 U/mg) e inhibidor de proteasas [1 tableta por cada 10 ml de tampón; Pierce Protease Inhibitor (Mini)Tablets (EDTA-free), Thermo Fisher Scientific] para prevenir la degradación de la proteína de interés por acción de proteasas endógenas de las bacterias. De manera aproximada, para los pellets bacterianos correspondientes a 250 ml de cultivo, se utilizaron 3 ml de tampón LEW suplementado. Se incubó con este tampón 30 min en frío para que actuase la lisozima y después se sonicó con punta a 65% de amplitud con ciclos de sonicación de 15 segundos con 15 segundos de reposo entre ciclos, hasta un tiempo total de 5 min. A continuación, se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4°C, y se separó y filtró el sobrenadante por una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm para eliminar posibles bacterias o agregados que quedasen

presentes. En este sobrenadante se encuentra la fracción total de proteínas solubles de las bacterias, entre las cuales está la proteína de interés sobreexpresada que ha de purificarse en un paso posterior.

2.5. Purificación de las proteínas recombinantes

Para la purificación de la STxB:6xHis, se utilizaron columnas de Níquel Protino Ni-TED 1000 (Machery-Nagel). Esta purificación se basa en la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC); los residuos de histidina de la proteína se unen a los iones Ni^{2+} de la resina de la columna y después, gracias a un tampón con imidazol, éste se coordina con los iones Ni^{2+} y desplaza a la proteína unida.

Siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, primero se equilibró la columna con 2 ml de tampón LEW 1X (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8), y a continuación se añadió el sobrenadante de la lisis bacteriana filtrado, momento en el que queda unida la proteína con las histidinas a la resina de la columna. Después de lavar con 4 ml de tampón LEW para eliminar el exceso de proteínas que no se hubiesen unido a la columna, finalmente se eluyó la proteína unida añadiendo 4.5 ml de buffer de elución con imidazol (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imizadol, pH 8).

Para eliminar el imizadol de la solución y que así no interfiriese en la posterior funcionalización de los NMs, se utilizó una columna de desalinización PD-10 con resina de Sephadex® G-25 (GE Healthcare Life Sciences™) para transferir la proteína a PBS 1X. Para ello, siguiendo el protocolo, se equilibró la columna con unos 24 ml de PBS 1X filtrado. A continuación, se cargaron 2.5 ml de la proteína purificada y, finalmente, se eluyó en 3.5 ml de PBS 1X. Para conservar a corto-medio plazo la proteína a 4 °C, se añadió azida sódica al 0.1% (p/v).

2.6. Conjugación de STxB-6xHis con FITC

A diferencia de la GFP, que tiene fluorescencia endógena, la proteína quimera STxB:6xHis no muestra fluorescencia. Por ello, para poder realizar un seguimiento de la proteína cuando se funcionalizase con ella las NPs en determinados experimentos, se procedió a conjugarla con un fluoróforo, en este caso el isotiocianato de fluoresceína (FITC, isómero I, Sigma-Aldrich). A través del grupo isotiocianato, y en condiciones de pH ligeramente básico, dicho fluoróforo es capaz de unirse a los grupos amino no protonados de la proteína, principalmente el amino-terminal y también a los de residuos de lisina, formando un enlace tiourea.

Para la conjugación de la proteína con FITC, por cada ml de proteína en PBS 1X se añadieron 100 µl de tampón bicarbonato sódico 1 M a pH 8.8. Manteniendo la proteína en agitación constante, se añadieron 50 µl de una solución de FITC a 5 mg/ml en DMSO muy lentamente, y manteniendo la agitación se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Para eliminar el exceso de FITC no conjugado, la mezcla de reacción se pasó por una columna PD-10 de desalinización. Tras el equilibrado con PBS 1X, se cargó la mezcla de reacción, observándose una primera fracción conteniendo la proteína conjugada al fluoróforo, que se eluyó con 3.5 ml de PBS 1X, quedando en la parte superior de la columna, claramente separada y diferenciada una segunda fracción que correspondía con el exceso de fluoróforo no conjugado.

2.7. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los métodos más usados para el análisis de mezclas de proteínas en función de sus pesos moleculares. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras de proteína se desnaturizan por calor y por tratamiento con agentes reductores como el 2-mercaptoetanol, que rompe

los puentes disulfuro de las proteínas, y el dodecilsulfato sódico (SDS), que ayuda a desnaturalizar y, además, confiere a las proteínas una carga neta negativa. Así, todas viajan hacia el ánodo, separándose en función únicamente de su peso molecular. Se puede entonces determinar el peso molecular de cualquier proteína comparando con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos que también se cargan en el gel.

Esta técnica se utilizó para verificar las diferentes fracciones del proceso de sobreexpresión en bacterias, así como la posterior extracción y purificación de las proteínas recombinantes. También se empleó en los posteriores estudios de funcionalización de NMs para analizar la proteína unida en superficie. En el caso de los cultivos bacterianos, se tomaron antes y después de la inducción muestras de 500 μ l, centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min y resuspendiendo el pellet en 50 μ l de tampón de carga 1X (*stock* 4X: Tris-Cl 200 mM (pH 6.8), 8% SDS, 40% (v/v) glicerol, 2-mercaptoetanol 400 mM, 0.4% (p/v) azul de bromofenol). Se tomaron también muestras de todos los pasos en el proceso de lisis y purificación de la proteína para evaluar su eficiencia y localizar en qué fracciones aparece la proteína de interés; en este caso, se tomaron 37 μ l de cada fracción a los que se añadieron 13 μ l de tampón de carga 4X. Todas las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas previa a la carga en el gel.

Se utilizaron geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 12% (Bio-Rad) y en otras ocasiones del 12% (TruPAGE Precast Gels, Sigma-Aldrich). Éstos últimos permiten una mejor separación de proteínas de bajo peso molecular, como es el caso de STxB:6xHis (<11 kDa). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 180 V hasta que el frente de migración alcanzase la línea marcada en el *cassette* del gel. En cada gel se cargaron 2.5 μ l del patrón de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad), que contiene una

mezcla de 10 proteínas recombinantes de pesos moleculares conocidos entre 10 y 250 kDa.

La técnica utilizada para detectar las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida fue la tinción con azul de Coomassie, un colorante con elevada afinidad por las proteínas y que permite teñirlas de manera sencilla en presencia de un medio ácido. Para la fijación y tinción de las proteínas, se sumergió el gel en una solución de azul de Coomassie (Fisher Bioreagents) al 2.5% (p/v), 10% (v/v) de ácido acético (99%, Cofarcas) y 45% (v/v) de metanol (extrapuro, Scharlau). Pasada 1 h, se retiró la tinción y se procedió a desteñir el gel en una solución con 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) metanol, renovando varias veces la solución hasta que se apreciaran bien contrastadas las bandas de proteína. Para su conservación y documentado, los geles se mantuvieron en agua destilada. Los geles se documentaron en el sistema automatizado de imagen Doc™ EZ System (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD, para ser posteriormente analizados con el programa Image Lab (Bio-Rad).

2.7.1. Cuantificación de proteínas a partir de geles SDS-PAGE

En determinados experimentos, se requirió una cuantificación de proteína a partir de los geles tras su tinción con Coomassie. Para ello, llevó a cabo una cuantificación de los mismos utilizando el programa *ImageJ* y su herramienta “Geles”; esta herramienta analiza cada banda del gel y las representa en forma de gráfica con picos de área proporcional a la intensidad de la banda. De esta forma, tomando una banda de proteína como referencia, se puede llevar a cabo una determinación, de carácter semi-cuantitativo, de la cantidad de proteína en una determinada banda del gel.

2.8. Funcionalización de NMs con las proteínas recombinantes

Para la funcionalización de los NMs, bien de SiO₂ o recubiertos de SiO₂, con las proteínas recombinantes, en primer lugar, se lavaron las NPs con agua

destilada para eliminar el etanol en el que se conservan y evitar que afectase a la proteína y a su unión. Tras estos lavados, se añadió a los NMs una solución de proteína purificada en exceso en PBS 1X y se sonicó con punta para la funcionalización (Sonics Vibracell VCX 130W; amplitud 30%, 3 pulsos de 2 segundos con 2 segundos de descanso entre pulsos). Para retirar el exceso de proteína sin unir, se centrifugó un mínimo de 3 veces (10 min aprox. a 8000 rpm, en función del NM), resuspendiendo en cada lavado con PBS 1X. Con estos lavados se consiguió retirar la denominada *soft corona*, es decir, aquellas proteínas que se habían unido de manera más débil e inespecífica, manteniendo las proteínas en contacto directo con la superficie con gran afinidad, la *hard corona* (Figura 18) (Monopoli *et al.*, 2013).

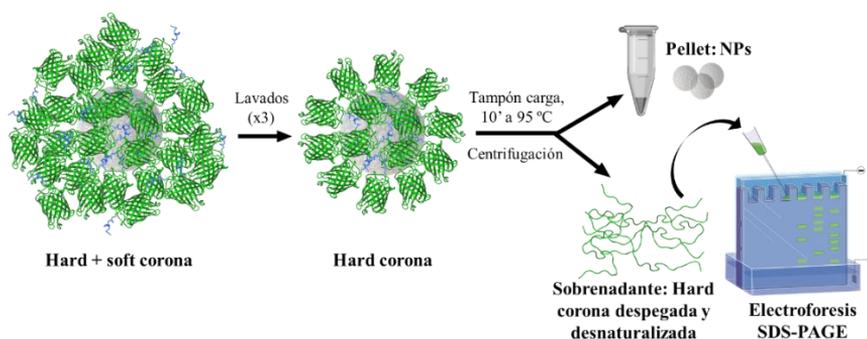


Figura 18. Proceso de tratamiento de las NPs funcionalizadas para el análisis de la proteína unida en superficie mediante SDS-PAGE. Tras la funcionalización con la proteína de interés y el primer lavado de exceso de proteína, sobre las NPs quedan adsorbidas tanto las proteínas con mayor afinidad sobre la superficie (*hard corona*) como otras con menor afinidad e interaccionando con la *hard corona* (*soft corona*). Tras 3 lavados, sobre las NPs quedan unidas únicamente las NPs de la *hard corona*. Mediante un tratamiento con tampón de carga y calentando a 95 °C, seguido de centrifugación, se obtiene un sobrenadante que contiene las proteínas de la *hard corona* despegadas y desnaturalizadas, listas para cargarlas en los geles de SDS-PAGE.

Para verificar la funcionalización, se recogieron muestras para SDS-PAGE; para ello, las NPs funcionalizadas y lavadas se trataron con tampón de carga para desnaturalizar y despegar la proteína de la superficie de las NPs. Tras este

tratamiento, se centrifugaron las partículas (10 min a 8000 rpm) y se cargó en los geles el sobrenadante correspondiente a la proteína unida a aproximadamente 50 µg de NPs.

2.9. Ensayos de la estabilidad de la funcionalización

Con el fin estudiar la estabilidad de la biofuncionalización basada en proteínas recombinantes que contengan una secuencia de varias histidinas como soporte de unión, se utilizaron como modelo la construcción de 6xHis:GFP y partículas de SiO₂ de 500 nm. El elevado tamaño de partícula, junto con la fluorescencia propia de la proteína, facilitaron la visualización de las partículas y el estado de la cobertura proteica mediante microscopía confocal de fluorescencia.

2.9.1. Digestión enzimática de la secuencia 6xHis

Para demostrar que la orientación de la proteína en la superficie de las partículas viene dada mayoritariamente por la secuencia de histidinas, se realizó un experimento comparando la conjugación de la proteína completa frente a su versión sin histidinas. Para ello, se realizó una digestión enzimática de la secuencia 6xHis con tripsina. Tras comprobar con la herramienta *PeptideCutter* de *ExPASy* que la proteína presentaba sitios de corte con tripsina (Figura 19A), se incubó una solución de 6xHis:GFP purificada con tripsina (tripsina 0.5%-EDTA 10X, Thermo Fisher) al 0.025% en PBS 1X (pH 7.4) a 37 °C durante 10 min, siguiendo protocolos ya descritos (Hubbard, 1998). Para detener la reacción de proteólisis, se añadió tampón de carga desnaturizante. La proteína resultante tiene un tamaño de ~27 kDa (Figura 19B), de acuerdo con el análisis de los sitios de corte. Posteriormente, se funcionalizaron partículas de SiO₂, tanto con la proteína digerida, GFP, como con 6xHis:GFP. Se analizaron mediante SDS-PAGE, tanto la proteína unida a las partículas en cada caso, como el sobrenadante de los lavados tras la conjugación (proteína no unida a las partículas).

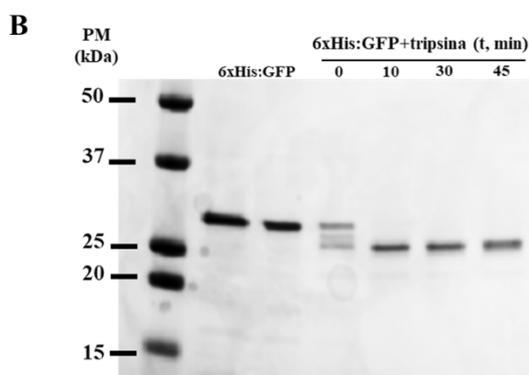
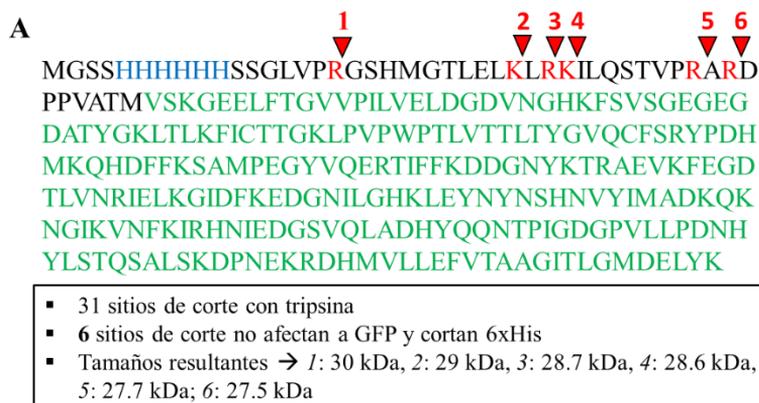


Figura 19. Digestión enzimática de 6xHis:GFP con tripsina. (A) Secuencia aminoacídica de la proteína 6xHis:GFP, con los sitios de corte por la proteasa tripsina marcados en rojo. Se han marcado únicamente los sitios que eliminarían la secuencia 6xHis (en azul) sin afectar a la estructura de la GFP (marcada en verde). (B) Comprobación mediante SDS-PAGE de la proteólisis de 6xHis:GFP tras diferentes tiempos de incubación con tripsina a 37 °C, obteniéndose mayoritariamente una proteína de ~25 kDa.

2.9.2. Estudio de la estabilidad de la unión de 6xHis:GFP en diferentes condiciones de pH y concentración de sal

Se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de la unión de la proteína a la superficie de las partículas en diferentes condiciones de pH y sal, tanto las fisiológicas que podrían encontrarse en distintos compartimentos de la célula o tejidos, como condiciones más extremas. En el caso de los ensayos a diferente pH, se prepararon tampones a diferente pH, seleccionados para mantener la misma fuerza iónica en todos ellos: pH 5.2, MES 250 mM; pH 6.0,

Materiales y métodos

MES 100 mM; pH 6.5, 20mM NaH₂PO₄; pH 7.0, 20mM NaH₂PO₄; pH 8.0, 50mM Tris-HCl; pH 9.0, 150mM Tris-HCl (todos los reactivos usados se obtuvieron de Sigma-Aldrich). Para estudiar la influencia de la concentración de sal (NaCl), se prepararon dos tampones, uno de composición 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl (PanReac AppliChem), pH 7.4, y otro exactamente igual con NaCl 1M. Estas dos soluciones se mezclaron en las correspondientes proporciones para obtener las soluciones finales con concentraciones de NaCl de 0, 0.15, 0.3, 0.5, 0.75 y 1 M. Tras la conjugación de una solución de partículas de SiO₂-500 nm con 6xHis:GFP, ésta se repartió en alícuotas idénticas y se añadieron a cada una las correspondientes soluciones de diferente pH y concentración de NaCl. Se incubaron a 37 °C durante 2 h en agitación suave en noria, posteriormente se hicieron 3 ciclos de centrifugación y lavado con PBS 1X, para finalmente resuspender tras el último lavado en tampón de carga, para su análisis mediante SDS-PAGE. Se hizo una cuantificación relativa a la cantidad de proteína adsorbida tras las incubaciones en condiciones de pH 7 y NaCl 150 mM, tomadas como referencia al ser las condiciones fisiológicas en las que se funcionalizan las partículas. El experimento completo se realizó por triplicado y se realizó una media de las tres cuantificaciones.

2.9.3. Estudio de la estabilidad de la unión en condiciones fisiológicas

Para evaluar la estabilidad de la unión de la proteína quimera modelo 6xHis:GFP en la superficie de partículas de SiO₂ tras la exposición a condiciones biológicas, en primer lugar se incubó una solución de partículas de SiO₂ biofuncionalizadas en una solución 137 mM NaCl, pH 7.4 con un 30% de FBS a 37 °C, y se tomaron alícuotas a 1, 4, 24, 48 y 72 h tras la incubación. Las muestras a los diferentes tiempos se lavaron 3 veces con PBS 1X (centrifugación a 7000 rpm, 10 min), y finalmente se resuspendieron en 50 µl de tampón de carga 1X para su análisis mediante SDS-PAGE. El experimento

se realizó por triplicado, y las cuantificaciones de los geles se realizaron con el programa *ImageJ*, tal y como se ha descrito anteriormente (Apartado 2.7.1.).

3. Ensayos en cultivos celulares

3.1. Líneas celulares empleadas y condiciones de cultivo

Las líneas celulares con las que se trabajó a lo largo de esta Tesis aparecen recogidas en la Tabla 1. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37 °C, con unos niveles de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

Tabla 1. Líneas celulares empleadas

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Identificación de ATCC
Detroit 562	Células humanas de carcinoma escamoso de faringe	MEM 10% FBS	ATCC® CCL-138™
HeLa	Células humanas de cáncer de cuello de útero	MEM 10% FBS	ATCC® CCL-2™

3.2. Viabilidad celular

Tanto las NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC como los AuNRs@SiO₂-RBITC sintetizadas fueron incubadas en cultivos de células Detroit 562 para testar su posible citotoxicidad. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, y tras 24 h se añadieron los dos tipos de NMs a concentraciones de 5 y 15 µg/ml. Para el análisis de la viabilidad celular tras 24, 48, 72 y 96 h de incubación, se utilizó el método de tinción por exclusión con azul de tripán. Con este método, las células vivas, con su membrana intacta, excluyen el colorante y quedan sin teñir, mientras que las células necróticas, cuyas membranas se encuentran dañadas y permeabilizadas, se tiñen de color azul. Para su evaluación, se diluyó

Materiales y métodos

el azul de tripán (solución al 0.4%, Sigma-Aldrich) con las células en medio de cultivo 1:1 (v/v) y se contaron con el equipo TC20™ *Automated Cell Counter* (Bio-Rad). Cada incubación se realizó por triplicado en experimentos independientes, poniendo siempre en paralelo los correspondientes controles de células sin tratamiento con NMs. Para evaluar el crecimiento de las células, así como su morfología respecto a las células control, también se tomaron imágenes de las células vivas a los diferentes tiempos de incubación con un microscopio de contraste de fases Nikon eclipse TS100F invertido con una cámara digital Progress CT5 (Jenoptik).

3.3. Inmunofluorescencia

Los NMs funcionalizados con STxB:6xHis se añadieron a los cultivos de células que presentan el receptor Gb3 para analizar la interacción entre ambos y, por tanto, la entrada específica de las NMs vía dicho receptor. Para ello, se cultivaron las células sobre cubreobjetos de borosilicato redondos de 10 mm de diámetro (Thermo Fisher) un mínimo de 24 h antes de realizar la inmunofluorescencia.

Se recogieron muestras a diferentes tiempos tras la adición de los distintos NMs funcionalizados (a una concentración de ~5 µg/ml), se lavaron con PBS 1X y se fijaron incubando durante 20 min con paraformaldehído (Alfa Aesar) al 4% en PBS 1X. Para estudiar la co-localización de las NMs con el receptor Gb3, se tiñeron las muestras con el anticuerpo primario rata anti-Gb3 conjugado con Alexa647 (clon 5B5, BD Biosciences) a una dilución de 1:100. La muestra se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con dicho anticuerpo y, posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 min cada uno con PBS-T (Tritón X-100) al 0.1 %. Para la visualización de la actina en determinadas muestras, se utilizó Faloidina conjugada con TRITC (Isotiocianato de Tetrametilrodamina B; Sigma Aldrich). Para visualizar los núcleos se utilizó Hoechst 1:4000 (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich). Para su almacenamiento, los

cubreobjetos fijados se dejaron en una solución de PBS + 0.1 % de azida sódica (NaN_3) a 4 °C. Las muestras se montaron en medio Inmu-Mount (Thermo Fisher) sobre portamuestras (CellPath). Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio confocal Nikon A1R equipado con varios láseres de longitudes de onda: 405, 488, 514, 561, 633 nm, y con dos sistemas de detección: por filtros en cuatro canales y espectral de 32 canales con tres rejillas de difracción diferentes. Se emplearon los objetivos con las aperturas numéricas (NA) correspondientes: 10X (0.45 NA), 20X (0.75 NA), 60X (1.3 NA), y 100X (1.49 NA).

3.4. Análisis de localización subcelular de las NPs mediante TEM

Para analizar la internalización y la localización de las NPs funcionalizadas con STxB:6xHis en las células Detroit 562 a diferentes tiempos (30 min, 2 h y 24 h), se tomaron imágenes de microscopía electrónica. Las células a analizar se lavaron dos veces con PBS 1X, y se fijaron durante 1 hora con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0.12 M (pH 7.4). Para aumentar el contraste de las membranas celulares, se realizó una post-fijación durante 1 hora y media en tetraóxido de osmio al 2% a temperatura ambiente. Después de varias etapas de lavado con tampón fosfato 0.1 M, la muestra se deshidrató en una serie gradual de acetona (99.6%, Labkem):

- Acetona 30%, 15 minutos
- Acetona 50%, 15 minutos
- Acetona 70% + acetato de uranilo 1%, 30 minutos
- Acetona 80%, 30 minutos
- Acetona 90%, 30 minutos
- Acetona anhidra, 30 minutos (dos pasos)
- Óxido de propileno, 30 minutos (dos pasos)

Posteriormente la muestra se integró en una resina tipo Durcupan (Fluka, Sigma- Aldrich) y la polimerización se llevó a cabo en una estufa a 60 °C durante 48 h. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm 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 el proceso de fijación y tratamiento para la inclusión en resina fue llevado a cabo por Débora Muñoz, técnica de laboratorio del grupo de Nanomedicina. Los cortes se realizaron en el ultramicrotomo Leika® del Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina (UC). El microscopio electrónico utilizado para el análisis de las muestras fue un JEOL JEM 1011 equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución (ubicado en IDIVAL).

4. Hipertermia fotoinducida

4.1. Calentamiento de los nanomateriales en suspensión

Para conocer la capacidad de transformar la potencia de un láser en calor y, por tanto, la capacidad que tienen las NMs utilizados para su aplicación en un tratamiento por hipertermia en células tumorales, se hicieron estudios previos con los NMs en suspensión.

Un volumen conocido de NMs en suspensión coloidal (2 ml) se añadió a una cubeta de cuarzo, la cual se cubrió con papel de aluminio dejando en éste únicamente un pequeño orificio de entrada y salida del láser para determinar la potencia transmitida. Se colocó el láser a una distancia aproximada de 30 cm de la cubeta, con un tamaño del *spot* láser de unos 3 mm de diámetro. Para registrar el calentamiento de las NPs en función del tiempo, se sumergió en la muestra un termómetro tipo termistor y se recogieron los valores de temperatura en función del tiempo. Como láser se empleó un diodo láser de

808 nm de 1W de potencia máxima (regulable) el tiempo necesario hasta que el sistema alcanzó una temperatura estacionaria (equilibrio termodinámico), momento en el que se apagó el láser y se procedió a analizar el enfriamiento de la suspensión coloidal recogiendo la temperatura en función del tiempo hasta temperatura ambiente.

4.2. Fotoactivación de las NPs en cultivos celulares

Para evaluar el efecto citotóxico de los diferentes NMs sintetizados tras su fotoactivación con láseres NIR, se cultivaron células Detroit 562 en placas de 35 mm (*μ-Dish, Polymer Coverslip Bottom, Ibidi*). Tras 24 horas, se añadieron tanto NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ como $\text{AuNRs}@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ funcionalizados con STxB:6xHis al medio de cultivo de células Detroit562, a concentraciones de 5 y 15 $\mu\text{g/ml}$. Se dejaron incubar durante 2 h, y se añadió al medio de cultivo yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ para visualizar las células necróticas. Éste se empleó ya que, al dañarse la membrana celular, las células captan el colorante y se tiñen de color rojo. Se irradiaron las células vivas en cultivo con los NMs con el láser de diodo de 808 nm a 1W de potencia, situándolo a ~15 cm sobre la placa de cultivo en divergencia, de modo que se irradió la mayor área posible, durante diferentes tiempos. Tras el apagado del láser, se monitorizó la zona de cultivo irradiada (previamente marcada), tomando imágenes secuencialmente con el equipo de imagen fluorescente ZOE Cell Imager (Bio-Rad), hasta varias horas después de la exposición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis y caracterización de los nanomateriales

1.1. Análisis mediante TEM de la morfología, recubrimiento y distribución de tamaños de los NMs sintetizados

En esta Tesis, se ha escogido trabajar con *nanorods de oro* (AuNRs) y con NPs de óxido de hierro (Fe_3O_4) por su biocompatibilidad y por sus múltiples propiedades aplicables en la nanomedicina del cáncer, destacando entre otras su capacidad de calentarse tras absorber luz infrarroja, pudiendo ejercer una terapia antitumoral mediante hipertermia fotoinducida. También se ha trabajado en la modificación de la superficie para adecuarlos a sus aplicaciones en CCC. En concreto, para el recubrimiento de estos NMs se ha utilizado sílice (SiO_2), un material biocompatible, de espesor y porosidad controlables, estable y con transparencia óptica. Por sus grupos funcionales, permite la conjugación de multitud de moléculas; en este trabajo, se ha incorporado de manera covalente en la capa de SiO_2 un fluoróforo, el RBITC, que va a permitir determinar la localización de los NMs en células y tejidos tras su administración. Además, a pH fisiológico, la sílice está cargada negativamente, lo que va a servir, por un lado, para favorecer su dispersión y, por otro, para tener una plataforma para la biofuncionalización de los NMs para su direccionamiento (ver Resultados, Apartado 2).

La morfología y dimensiones de todos los NMs sintetizados, así como el grosor de la capa de SiO_2 que los recubre, se evaluó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La Figura 20A muestra las imágenes de Fe_3O_4 previas al recubrimiento, con forma esférica y con un diámetro promedio de 9.9 ± 2.5 nm, donde se han contabilizado más de 300 partículas. Gracias al recubrimiento con grupos oleato en la misma reacción de síntesis hidrotermal, se previene la agregación de las NPs, manteniéndolas dispersas y facilitando así su posterior recubrimiento, en este caso con SiO_2 . Con las cantidades de reactivos utilizada en la reacción, se obtuvo un grosor de capa de 15 nm, estimado a partir de las

Resultados y discusión

imágenes obtenidas por TEM (Figura 20B). Se puede apreciar cómo la gran mayoría de las NPs de Fe_3O_4 se han recubierto de manera individual y, aunque aparecen algunas con varios núcleos o por el contrario sin ellos (esferas compuestas únicamente de SiO_2) en ambos casos, la contribución es mínima. Además, el hecho de incluir el fluoróforo RBITC conjugado covalentemente en la capa de SiO_2 , no parece influir en la formación y en la morfología final de la capa. El carácter magnético de las NPs permite además seleccionar únicamente aquellas que incluyen un núcleo de Fe_3O_4 y desechar las de SiO_2 .

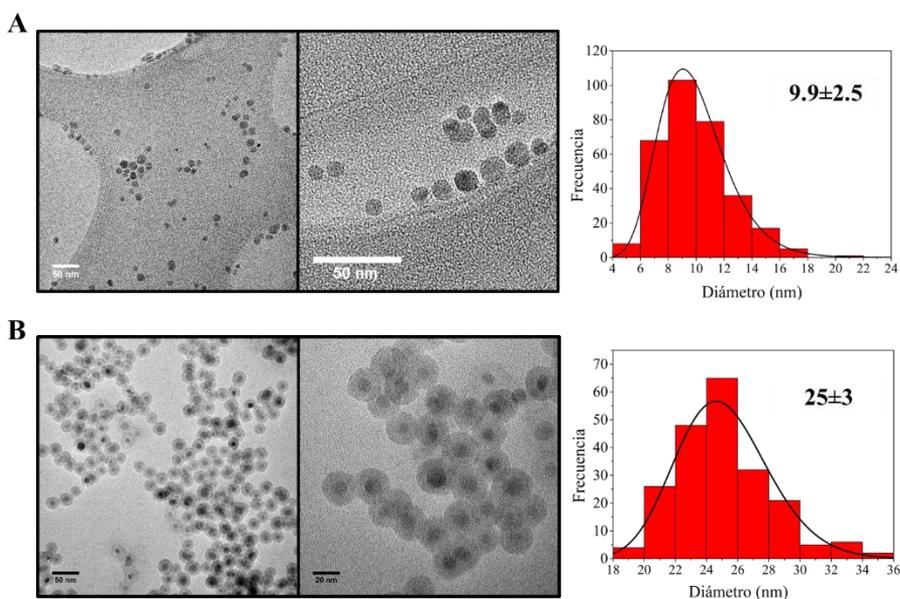


Figura 20. Imágenes de TEM y análisis de distribución de tamaños de las NPs de Fe_3O_4 . (A) Imágenes de las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas por método hidrotérmico previo recubrimiento, con unas dimensiones de 9.9 ± 2.5 nm de diámetro ($N = 318$). (B) Imágenes a diferentes magnificaciones de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -RBITC, con un diámetro promedio total de 25 nm y, por tanto, un grosor de capa de ~ 15 nm ($N = 210$). A la derecha se muestran las gráficas con las distribuciones de tamaño correspondientes.

En la Figura 21A se muestran los AuNRs sintetizados, con un tamaño promedio de 52.0 ± 4.7 nm de largo y 14.0 ± 1.4 nm de ancho, y una relación de aspecto de 3.7 ± 0.4 . Se puede apreciar la formación de otras NPs con

diferente morfología, como esferas o cubos, ya que es complicado evitar su crecimiento en la reacción. Sin embargo, la proporción de estas formas es mínima en comparación con la cantidad de AuNRs obtenida, y no va a afectar a las propiedades globales de cara a su aplicación posterior.

En cuando a su recubrimiento con SiO₂, la estrategia es diferente a la seguida con el Fe₃O₄ por la naturaleza de las NPs. Con los métodos de síntesis utilizados, las NPs son únicamente dispersables y estables en agua. Para evitar su agregación al transferirse a un medio con alcohol para el recubrimiento de SiO₂, es necesario el uso de algún tipo de molécula que sustituya al CTAB de la superficie de los AuNRs, y que permita la transferencia a un medio distinto del agua. Otra de las limitaciones que ofrece el oro es su reducida afinidad por la mayoría de los grupos funcionales, reduciéndose casi exclusivamente a los grupos tioles, por los que presenta una elevada afinidad. Así, una de las estrategias más efectivas y utilizadas es el recubrimiento con PEG modificado por uno de sus extremos con un grupo tiol (PEG-SH) (Fernández-López *et al.*, 2009). En la Figura 21B se puede ver el resultado final del recubrimiento de los AuNRs con SiO₂ dopada con RBITC, con un grosor de capa de 34.6 ± 1.3 nm. El recubrimiento es homogéneo en todas los AuNRs, recubriéndose prácticamente en su totalidad de manera individual y sin la formación de partículas de SiO₂ independientes. El grosor de la capa puede regularse en función de las adiciones sucesivas de TEOS que se realicen (ver Figura 21C).

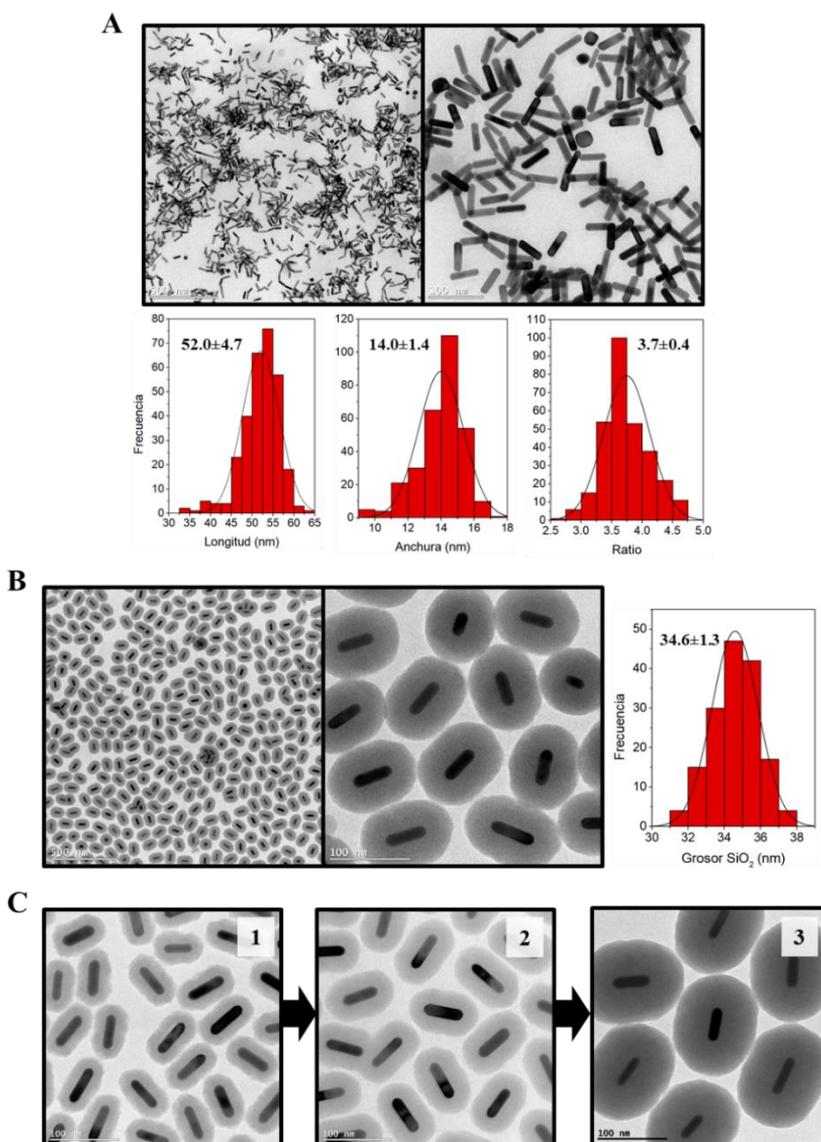


Figura 21. Imágenes de TEM y análisis de distribución de tamaños de los AuNRs sintetizados. (A) Imágenes a diferentes magnificaciones de los AuNRs sintetizados previo recubrimiento, con unas dimensiones de 52 nm de largo, 14 nm de ancho y una relación de aspecto de 3.7. Debajo de las imágenes se muestran las distribuciones de tamaño correspondientes. (B) Imágenes a diferentes magnificaciones de los AuNRs tras su recubrimiento con una capa de SiO₂ de 34.6 nm de grosor promedio. En todos los casos, el recuento y promedio se hicieron con $N = 150$. (C) Ejemplo de un crecimiento secuencial de la capa de SiO₂ (1=18 nm, 2=24 nm, 3=54 nm) tras sucesivas adiciones de TEOS.

Además, como ya se ha mencionado, para determinados experimentos se emplearon partículas de SiO_2 de 500 nm de diámetro como nanomaterial modelo. Este tamaño se empleó con el fin de facilitar su visualización por medio de técnicas de microscopía de fluorescencia confocal. En la Figura 22 se muestra una imagen de dichas partículas, con un tamaño promedio de 516 ± 29 nm.

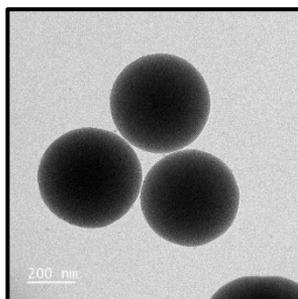


Figura 22. Imagen de TEM de las partículas de SiO_2 empleadas para pruebas de concepto en microscopio de fluorescencia confocal. El tamaño promedio de las mismas es de 516 ± 29 nm.

1.2. Caracterización estructural por difracción de rayos X

Las muestras de Fe_3O_4 sintetizadas con y sin recubrimiento de SiO_2 fueron analizadas mediante difracción de rayos X (XRD) para conocer más detalles estructurales. Los patrones de difracción de ambas muestras, refinados por el método de Rietveld, se muestran en la Figura 23. Los picos de difracción que aparecen en estos patrones son consistentes con la estructura cúbica de la magnetita; no obstante, no se descarta la presencia de trazas de maghemita (Fe_2O_3) ni de otras fases de impurezas, pero se encontrarían por debajo de la sensibilidad de la técnica. En el caso de las NPs recubiertas de SiO_2 , aparece un pico ancho en torno a $2\theta = 23^\circ$ ($d = 3.87 \text{ \AA}$), típico de un ordenamiento amorfo, correspondiente a la capa de sílice. A través de un análisis con el programa *TOPAS*, se pudo realizar una estimación del tamaño cristalino de las NPs de Fe_3O_4 , obteniéndose $13.2(3)$ nm y $8.9(3)$ nm en función del modelo de

análisis escogido. En el caso de las NPs recubiertas de SiO₂, los tamaños estimados son de 17.6(6) nm y 9.1(5). Estos tamaños son consistentes con los analizados a partir de las imágenes de TEM (Figura 20).

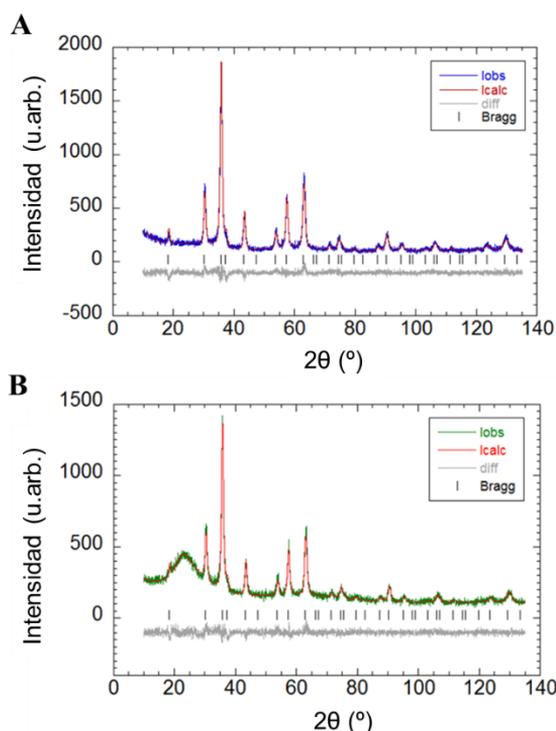


Figura 23. Patrones de difracción de rayos X de las NPs de Fe₃O₄. Se analizaron las muestras de Fe₃O₄ sin recubrir (**A**) y recubiertas de SiO₂ (**B**). Los picos corresponden con la estructura cúbica de la magnetita. El pico ancho a $2\theta = 23^\circ$ en (B) corresponde a la contribución de la sílice amorfa. Los parámetros estructurales estándar, así como la microestructura, se refinaron por el método de Rietveld.

1.3. Potencial ζ

La determinación del potencial ζ es una herramienta importante para caracterizar la carga superficial de los NMs y obtener una idea de la estabilidad a largo plazo de la suspensión coloidal. Generalmente, se considera que un valor de potencial ζ a partir de -30 mV o +30 mV es suficiente para que las fuerzas de repulsión superen a las de atracción y, por tanto, el sistema coloidal sea estable. Por el contrario, valores inferiores del potencial pueden resultar en

una inestabilidad y, consecuentemente, en la agregación de los NMs debido a fuerzas atractivas tipo van der Waals (Selvamani, 2019). De cara a una aplicación en un sistema biológico, esta agregación puede suponer que el sistema reticuloendotelial reconozca antes este cúmulo e intente eliminarlo del organismo, disminuyendo así el tiempo de circulación y su capacidad de acción.

La Figura 24 muestra los valores de potencial ζ en agua de los NMs sintetizadas, siendo de -52.1 ± 1.5 mV para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2\text{-RBITC}$ y de -48.8 ± 0.1 mV para los $\text{AuNRs}@SiO_2\text{-RBITC}$. En ambos casos, se trata de valores negativos y próximos a los -50 mV, suficientemente altos como para que la suspensión sea estable y los NMs no se agreguen. Así, los *stocks* de NMs sintetizadas, permanecen en suspensión varios meses. En el caso de las partículas de SiO_2 de 500 nm de diámetro, el valor de potencial es de -28.1 ± 0.4 mV, algo menor que en el caso de los otros NMs, probablemente debido al incremento del tamaño de partícula; sin embargo, sigue siendo un valor próximo a los -30 mV, límite a partir del cual se considera que el sistema va a ser estable.

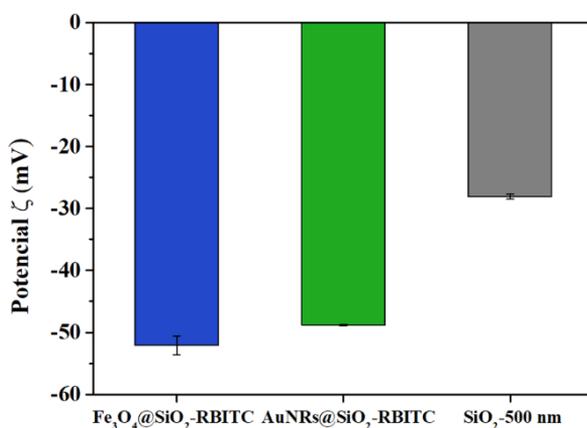


Figura 24. Medidas de potencial ζ de los NMs sintetizados. En todos los casos, los valores son negativos y próximos o inferiores a -30 mV, considerado como valor límite de estabilidad coloidal.

Además de dar información sobre la estabilidad de los NMs, el valor de potencial ζ sirve para determinar las posibles funcionalizaciones, fundamentalmente de carácter electrostático, que se pueden realizar en la superficie de los NMs aprovechando la carga intrínseca de diferentes aminoácidos. Como se desarrollará en más detalle en el Apartado 2, en esta Tesis se ha trabajado en la biofuncionalización con una construcción proteica consistente en el dominio de direccionamiento de interés (STxB), fusionado a una secuencia policatiónica de histidinas que se empleará como dominio de unión a la sílice y otros NMs de potencial ζ negativo. Es por ello primordial que los NMs a biofuncionalizar tengan una carga superficial negativa, como es el caso tanto de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ como las de $\text{AuNRs}@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ que se han sintetizado, así como las partículas de SiO_2 que se han usado como modelo.

1.4. Absorción UV-vis-NIR

Uno de los objetivos de esta Tesis es conseguir NMs que puedan servir como agentes para terapia fototérmica contra el cáncer. Esto va a depender en gran medida de la capacidad de los NMs escogidos para absorber luz y transformarla en calor. Por ello, es esencial analizar el espectro de absorción UV-vis-NIR para determinar en qué rango de longitud de onda absorben de manera más eficiente. Esto es especialmente importante en el caso de los NMs de oro, ya que como se ha descrito, la longitud de onda de SPR es dependiente de diversos factores, entre ellos la morfología y el tamaño, y va a determinar la longitud de onda del láser que se puede utilizar para realizar el calentamiento. Además, el espectro de absorción ha permitido obtener información sobre la calidad de las muestras sintetizadas; atendiendo a la anchura de la banda de absorción y a la aparición de bandas secundarias, así como tener una estimación de la monodispersidad de la muestra, de la presencia de NPs de diferente morfología o de una posible agregación de las NPs.

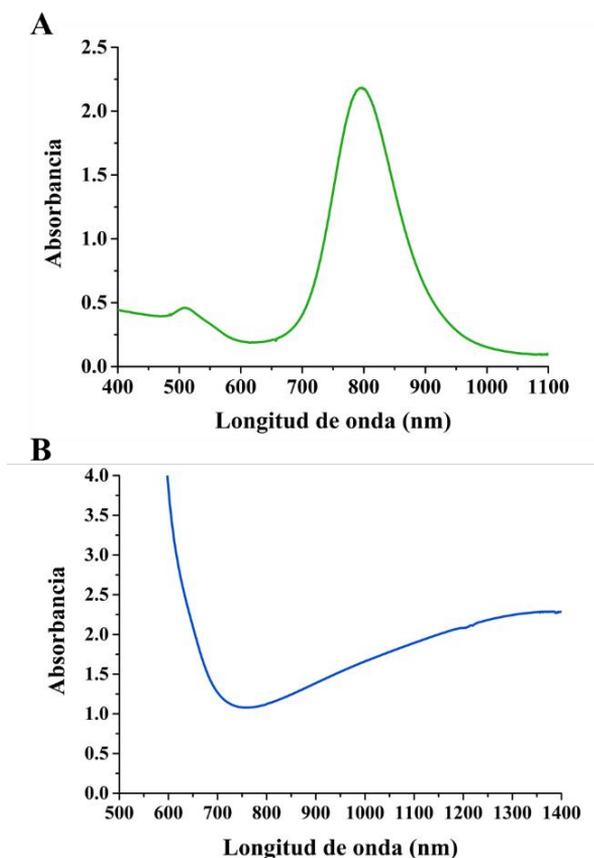


Figura 25. Espectros de absorción UV-visible de las diferentes NMs sintetizados. (A) Espectro correspondiente a los AuNRs, con una banda de SPR longitudinal en 797 nm. **(B)** Espectro de las NPs de Fe₃O₄. En este caso, a pesar de haber absorción, no hay ninguna banda característica.

En la Figura 25 se muestran los espectros de absorción de las diferentes muestras de AuNRs y Fe₃O₄. En ambos casos se llevaron a cabo medidas en transmisión y empleando una esfera integradora en cubeta delgada con el objeto de cuantificar, por una parte, la luz absorbida y, por otra, la contribución del scattering. En el caso de los AuNRs (Fig. 24A), se pueden distinguir dos bandas; la primera, en torno a 510 nm, corresponde a la banda SPR transversal (eje corto del NR) que es independiente del tamaño del AuNR, mientras que la segunda, en 797 nm, corresponde a la SPR longitudinal, que sí depende del

tamaño. El hombro que aparece en el pico de la zona de 550 nm viene dado por la contribución de las formas secundarias generadas en la síntesis como esferas o cubos (Scarabelli *et al.*, 2015), pero tal y como se ha visto también en las imágenes de TEM (Figura 21), esta proporción es mínima y no debe afectar significativamente a las propiedades ópticas. En cuanto al resto del espectro, la banda de la región NIR en torno a 800 nm es simétrica y relativamente estrecha, indicativo de la homogeneidad de la muestra.

En el caso de la magnetita (Fig. 25B), presenta absorción en la región UV-vis-NIR, pero a diferencia de los AuNRs, su espectro no tiene una forma definida con ningún pico característico. El patrón de este espectro ha sido documentado previamente, y se asocia principalmente a transferencias de carga para longitudes de onda menores a 600 nm y transiciones intraconfiguracionales *d-d* del hierro por encima de 600 nm (Espinosa *et al.*, 2016; Gómez-Salces *et al.*, 2012; Y. P. He *et al.*, 2005; J. Tang *et al.*, 2003). A pesar de la disminución de la absorción en la zona NIR, como se verá en el Apartado 4, las suspensiones de NPs de Fe₃O₄ son capaces de calentarse de manera eficiente tras la irradiación con el láser de 808 nm, permitiendo así su utilización en terapia por hipertermia fotoinducida.

1.5. Fluorescencia

Identificar la localización de los NMs tras su administración en células o modelos animales puede suponer todo un reto, especialmente en nanomateriales que no son fluorescentes de por sí. En este trabajo se muestra cómo la incorporación de un fluoróforo orgánico en la capa de SiO₂ supone una estrategia útil para solventar este problema, manteniendo la capacidad de poder realizar posteriores funcionalizaciones de superficie siguiendo diferentes estrategias (Bae *et al.*, 2012; Bijju, 2014; Goel *et al.*, 2014; Nallathamby *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2015).

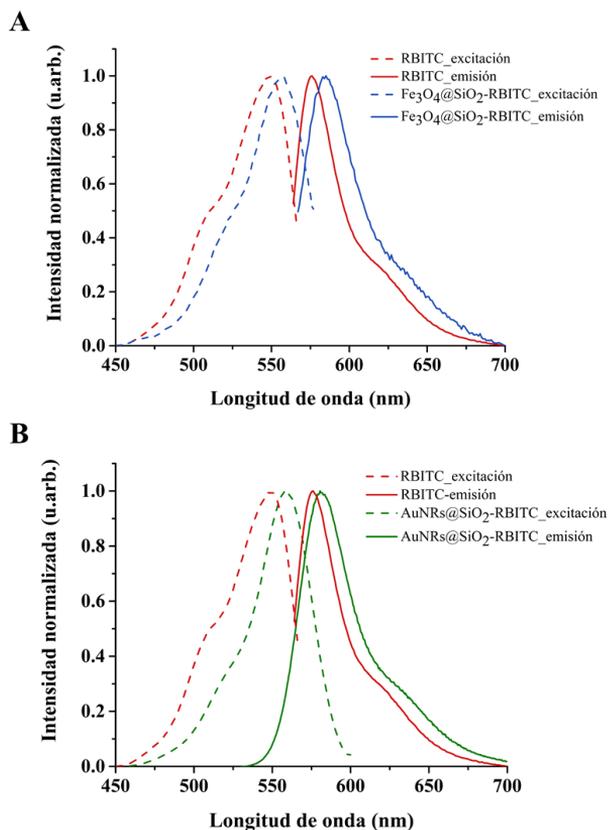


Figura 26. Espectros de excitación y emisión normalizados de los NMs sintetizados. Espectros correspondientes a las NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC (A) y de AuNRs@SiO₂-RBITC (B) en suspensión en etanol, cada uno en comparación con la solución del fluoróforo RBITC libre. En ambos casos, las longitudes de onda a las que se recogieron los espectros fueron $\lambda_{ex} = 550$ nm, $\lambda_{em} = 585$ nm.

Las propiedades ópticas de los AuNRs y de las NPs de Fe₃O₄ recubiertos con una capa de SiO₂ dopada con el fluoróforo RBITC se muestran en la Figura 26. En ella se comparan los espectros de excitación y emisión del fluoróforo libre en disolución con los espectros de las NPs con el fluoróforo incorporado en la capa. Los máximos de las longitudes de onda de excitación y emisión son muy similares en ambos casos; sin embargo, se producen ligeros desplazamientos de estos máximos que se pueden atribuir al diferente entorno de las moléculas de fluoróforo dentro de la matriz de SiO₂ frente al etanol en

disolución, así como a la diferente concentración respecto a la solución de partida (Tu *et al.*, 2009; Zehentbauer *et al.*, 2014). El gran número de moléculas de fluoróforo en la capa de SiO₂ permiten obtener NMs que van a poder ser fácilmente detectados mediante la microscopía confocal de fluorescencia o la citometría de flujo, permitiendo así el seguimiento de estos NMs no sólo en células en cultivo, sino también las vías de entrada y acumulación en células o tejidos tras experimentos *in vivo*.

Este sistema de incorporación de fluoróforos es además versátil, permitiendo la incorporación de otros con distinta longitud de onda de excitación/emisión (Navarro-Palomares *et al.*, 2019) que, en función de los requisitos de un determinado ensayo o experimento, permitan elucidar diferentes estructuras o componentes celulares mediante técnicas de tinción (ej, ADN con Hoescht o DAPI), marcaje por afinidad (citoesqueleto de actina con faloidina rodaminada, o microtúbulos con taxol fluorescente) o mediante inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes, evitando así solapamiento de los espectros de fluorescencia (un ejemplo de ello puede encontrarse en las Figuras 42, 43 o 45).

1.6. Medidas magnéticas

Las curvas de histéresis $M-H$ ($T = 300$ K) tomadas a temperatura ambiente correspondientes a las muestras de Fe₃O₄ y Fe₃O₄@SiO₂ se muestran en la Figura 27A. La reducción de la magnetización en la muestra de Fe₃O₄@SiO₂ respecto a la de Fe₃O₄ confirma de nuevo la formación de la capa de sílice. Los valores de la magnetización de saturación (M_s) son de 65 emu/g para la magnetita de partida, y de 12 emu/g para las NPs una vez recubiertas. La magnetita *bulk* tiene valores de M_s en torno a 90 emu/g, pero existe una reducción significativa cuando el tamaño de partícula se reduce a escala nanométrica debido al aumento de la relación superficie/volumen, así como a la frustración magnética que se produce en los átomos de la superficie. A partir

de estas curvas de histéresis, también se ha podido hacer una estimación del tamaño de partícula y del grosor de la capa. De acuerdo con la literatura, los valores de M_S arriba mencionados corresponden con un tamaño de nanopartícula de aproximadamente 10 nm (Goya *et al.*, 2003), confirmado con los valores obtenidos en el análisis de las imágenes de TEM. Asumiendo que el núcleo de magnetita es de 10 nm para todas las NPs de la muestra, se puede obtener el porcentaje de masa que supone el Fe_3O_4 , que es de un 19.4%, mientras que el 80.6% restante correspondería al recubrimiento de sílice. Esto permite estimar un volumen de Fe_3O_4 de $V = 3.423 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3$. Si además se asume que las NPs son perfectamente esféricas, el número de núcleos magnéticos en las NPs sería de $6.54 \cdot 10^{14}$, y si la capa de SiO_2 es homogénea y del mismo grosor para todas las NPs, el $V(\text{SiO}_2) = 5.208 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3$, que correspondería a un grosor de capa de 10.9 nm. Este valor obtenido parece razonable comparándolo con el obtenido a partir de las imágenes de TEM (Figura 20).

Con las curvas de histéresis se obtienen también los valores de coercitividad (H_C) a temperatura ambiente; para las dos muestras, $H_C \leq 16 \text{ Oe}$ (ver *inset* en la Figura 27A), lo cual indica que la mayoría de las NPs tienen un comportamiento superparamagnético (Morup *et al.*, 1995). Este comportamiento es de gran relevancia e imprescindible de cara a la aplicación de NPs magnéticas en clínica tanto como terapia (hipertermia magnética) como en diagnóstico (contraste de imagen), pues supone que, una vez retirado el campo magnético correspondiente, las NPs van a permanecer inactivas. En el caso del recubrimiento con SiO_2 , a pesar de mantenerse este comportamiento superparamagnético, la reducción del valor de M_S es muy notable. Esto va a comprometer su aplicación en terapia mediante hipertermia magnética, ya que va a disminuir en gran medida su capacidad de calentamiento tras la aplicación de campos magnéticos, tal y como ya se ha demostrado en diversos estudios (González-Fernández *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2012). Ya que el mecanismo de

calentamiento se debe fundamentalmente a pérdidas por histéresis, éste va a verse afectado por la disminución de la rotación de las NPs recubiertas de sílice, además de la disminución de la interacción entre NPs. Esta disminución de la interacción entre NPs se ve reflejada también en las curvas de los ciclos ZFC-FC (Figura 27B). A partir de ellas se puede obtener la temperatura de bloqueo, que indica la temperatura por debajo de la cual los momentos magnéticos están bloqueados; es decir, a temperaturas superiores a dicha temperatura, el material se va a comportar como superparamagnético. La notable disminución de la temperatura de bloqueo tras el recubrimiento con SiO₂ está relacionada principalmente con el aislamiento de las NPs y la consecuente disminución de la interacción entre ellas, al haberse recubierto mayoritariamente de manera individual.

Todos estos datos sobre las propiedades magnéticas de las NPs sintetizadas indican que probablemente no serían las candidatas ideales para aplicar en terapia mediante hipertermia magnética. Dado que el grosor de la capa de SiO₂ influye en la capacidad de calentamiento, si se opta por este tipo de recubrimiento, sería necesario modificarlo para reducir la capa al mínimo necesario para obtener NPs dispersables en agua. Como alternativa, si se modificase el diseño de la partícula para que la capa fuese de sílice mesoporosa y se introdujese un cargo (por ejemplo, un fármaco) en sus poros, el calor generado podría ser suficiente para estimular la liberación a demanda del fármaco. En este trabajo, sin embargo, se ha optado por realizar un calentamiento de las NPs mediante la aplicación de láseres NIR (ver Apartado 4), ya que para este tipo de hipertermia la sílice no disminuye en el mismo grado la capacidad de calentamiento, al ser ópticamente transparente y ser el mecanismo de calentamiento totalmente distinto.

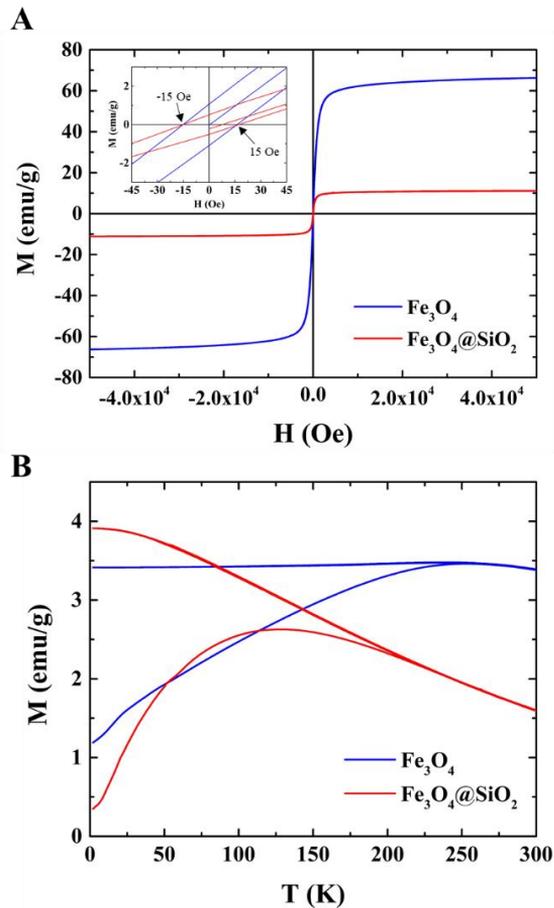


Figura 27. Propiedades magnéticas de las NPs de Fe_3O_4 recubiertas con SiO_2 . (A) Las curvas de histéresis muestran el comportamiento superparamagnético de las NPs recubiertas y sin recubrir. La capa de SiO_2 provoca una disminución notable del valor de M_s , mientras que H_C (mostrado en el *inset*) permanece constante. (B) Curvas FC-ZFC donde se muestra una disminución de la temperatura de bloqueo por el aislamiento de las NPs tras el recubrimiento con SiO_2 .

1.7. Biocompatibilidad

La evaluación de la bioseguridad de los nanomateriales es un aspecto crucial de cara a su utilización en prácticamente cualquier área, especialmente si se trata de aplicaciones biomédicas. Por ello, es necesario analizar exhaustivamente la toxicidad de los nanomateriales en todos los casos, ya que cada diseño particular puede tener respuestas diferentes al influir factores

Resultados y discusión

como el tamaño, la forma, la carga y química superficial, la dosis y el recubrimiento de los NMs. Además, en el caso de los NMs empleados en este trabajo, el objetivo es poder utilizarlos como agente diagnóstico o ejercer un efecto citotóxico a demanda, únicamente cuando se irradie la zona de interés con un láser NIR para ejercer terapia fototérmica. De esta manera se evitarían efectos secundarios indeseados resultado de la interacción inespecífica de estas NPs con células que no son diana del tratamiento.

Para evaluar si los NMs sintetizados producen algún efecto citotóxico, se incubaron células Detroit 562, el modelo empleado de CCC (células humanas derivadas de tumor faríngeo), con diferentes dosis (5 y 15 $\mu\text{g/ml}$) de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ y $\text{AuNRs}@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$. Se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h. En la Figura 28 se muestran imágenes de microscopía de contraste de fases representativas del cultivo celular al tiempo más corto (24 h) y el más largo (96 h) de incubación con ambos tipos de NMs. En todos los casos, se aprecia que independientemente de la dosis testada y el tiempo de tratamiento, las células mantienen su capacidad proliferativa y su morfología respecto a las células sin tratar. También se llevó a cabo un ensayo de viabilidad a los diferentes tiempos de incubación mediante tinción de las células necróticas con azul de tripano. Como queda reflejado en la Figura 29, de nuevo ni en las dosis ni en los diferentes tiempos de tratamiento se aprecia muerte celular.

Se escogieron dosis de tratamiento relativamente bajas para estos ensayos, ya que se busca aplicar estos NMs como agentes tópicos para diagnóstico y terapia de CCC, requiriéndose menores dosis que si se tratase, por ejemplo, de una inyección intravenosa. De hecho, como se verá en el Apartado 4.2., estas dosis de 5 y 15 $\mu\text{g/ml}$ son suficientes para provocar muerte celular por hipertermia fotoinducida. No obstante, está documentado en la literatura que NPs similares, recubiertas también de SiO_2 , presentan una alta

biocompatibilidad, con una viabilidad celular mayor al 80% incluso a dosis 10 veces mayores que las aquí testadas (Singh *et al.*, 2012).

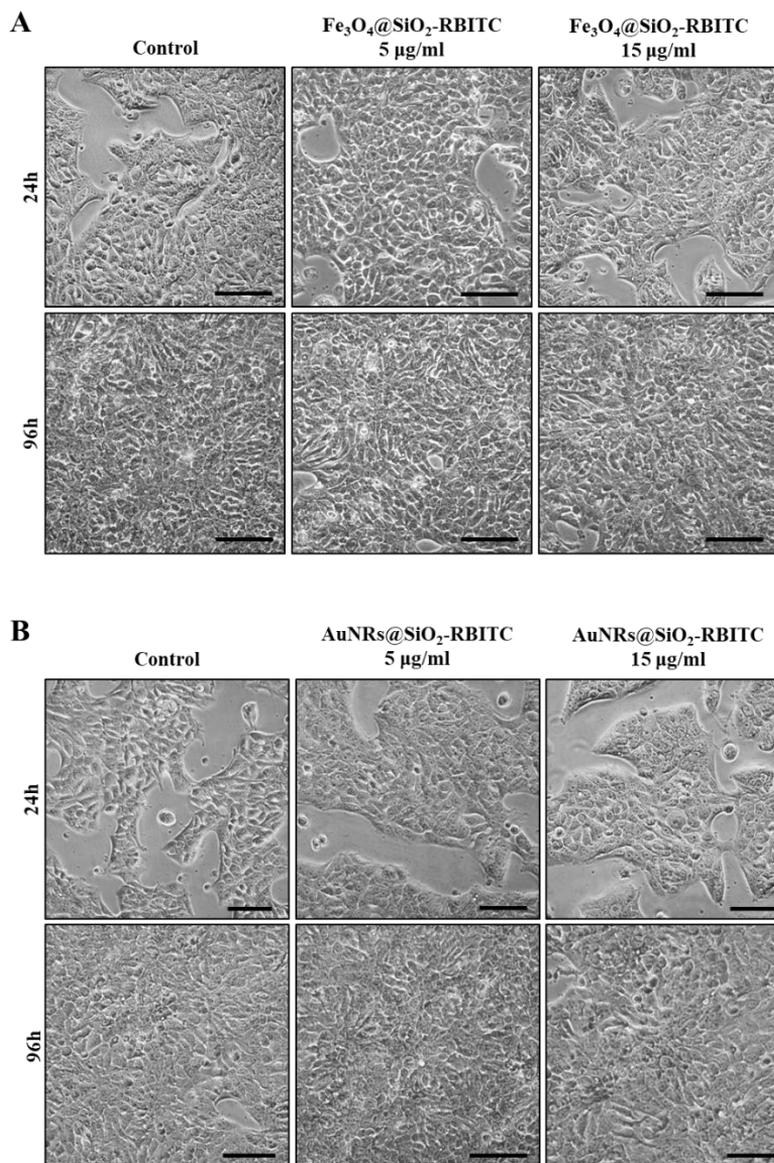


Figura 28. Imágenes de microscopio de contraste de fases de células humanas de cáncer de cabeza y cuello expuestas a los NMs sintetizados. Imágenes correspondientes al cultivo de células Detroit 562 incubado con 5 y 15 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ (A) y $\text{AuNRs}@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ (B) durante 24 y 96 h, así como de las células sin tratar. No se aprecian alteraciones en la morfología de las células ni en su capacidad proliferativa en ninguno de los casos. Barras de escala: 100 nm.

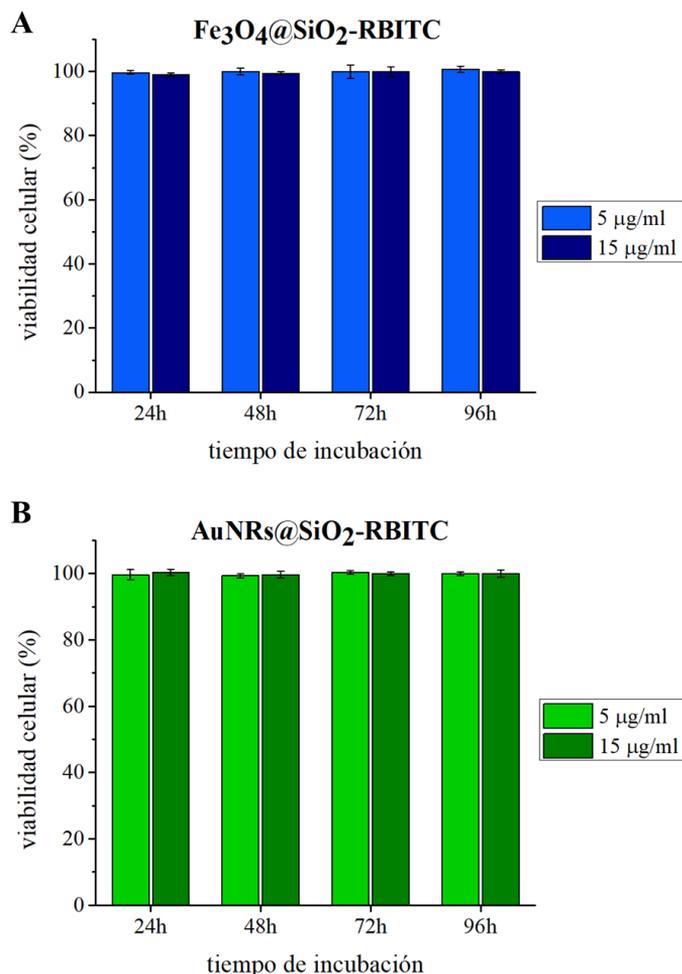


Figura 29. Cuantificación de la viabilidad de células Detroit 562 incubadas con los nanomateriales recubiertos de sílice fluorescente. (A) Las NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC se añadieron a concentraciones de 5 y 15 µg/ml, con ningún efecto citotóxico importante en ninguno de los casos a lo largo de los distintos tiempos de incubación. **(B)** Se observaron los mismos resultados en el caso de los AuNRs@SiO₂-RBITC, incubados a las mismas dosis y tiempos. La viabilidad está expresada relativa a células control no tratadas, que representan el 100% de viabilidad. Los datos se muestran como la media de tres réplicas experimentales independientes.

Además, la capa de SiO₂ que recubre al núcleo de magnetita le proporciona un carácter hidrófilo, ya que las NPs recién sintetizadas son dispersables únicamente en medios orgánicos, por lo que es necesaria una modificación

posterior para poder utilizarse como agentes de terapia o diagnóstico *in vivo*. En el caso de los AuNRs, aunque el oro de por sí no parece ser tóxico, sí que lo es el CTAB, el surfactante con el que quedan recubiertos tras su síntesis, cuando está en su forma libre en las células (Alkilany *et al.*, 2012). Se ha visto que es capaz de provocar daños mitocondriales y producción de ROS, desembocando en muerte celular por apoptosis y autofagia (Wan *et al.*, 2015). Así, tras su sustitución por PEG y el consecuente recubrimiento de SiO₂, se evitan efectos tóxicos para las células, proporcionando además todas las ventajas que ofrece la sílice como recubrimiento.

Por tanto, se puede concluir que los NMs que se han sintetizado, son biocompatibles a las dosis a las que podrían ser empleados su uso como agentes diagnósticos o terapéuticos.

1.8. Estabilidad del recubrimiento de SiO₂ en medios fisiológicos

Se conoce que la sílice es inestable en medios acuosos y que con el tiempo se hidroliza en ácido silícico (Si(OH)₄, pK_a 9.6), forma soluble en agua, por un proceso secuencial de hidratación, hidrólisis e intercambio de iones (Figura 30) (Croissant *et al.*, 2017). La velocidad de degradación va a depender del medio en el que se encuentre, así como del grado de saturación del sistema, es decir, de la concentración, ya que la acumulación de ácido silícico hará que en un determinado momento la reacción de degradación no se vea favorecida y, por tanto, ésta se ralentice. Además de estos factores, también van a ser cruciales las propiedades fisicoquímicas de las NPs como tamaño, forma, porosidad y grupos funcionales en superficie. Es por ello que, a pesar de la cantidad de publicaciones que estudian la degradación de NPs de SiO₂ en medios fisiológicos, no se pueden extraer conclusiones sistemáticas a partir de ellos debido a la gran variabilidad en las condiciones de estudio (Croissant *et al.*, 2017). Sin embargo, sí que está establecido que al contrario que la sílice mesoporosa, la sílice amorfa, como la utilizada en esta Tesis para el

recubrimiento de los distintos nanomateriales, se mantiene estable sin degradarse por períodos de tiempo más largos en condiciones fisiológicas. Mientras la sílice mesoporosa puede degradarse completamente en cuestión de pocas horas, la versión amorfa puede aguantar semanas o incluso no llegar a degradarse por completo, siempre en función del medio y la concentración en los que se realice el ensayo (Braun *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2012; Q. He *et al.*, 2010).

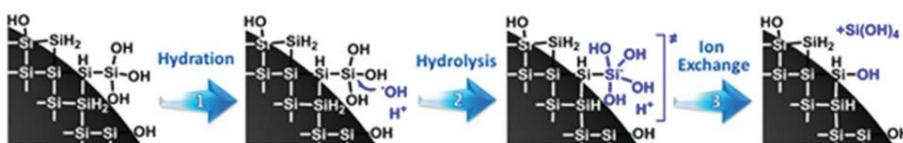


Figura 30. Secuencia del proceso de hidrólisis de la sílice en medios acuosos. Proceso secuencial en el que tiene lugar una hidratación (1), seguida de una hidrólisis (2) y un intercambio iónico (3) para finalmente dar lugar a la formación del ácido silícico (Si(OH)_4). Imagen tomada de la ref. (Croissant *et al.*, 2017).

En este contexto, se decidió realizar un estudio con las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ -RBITC sintetizadas para conocer la estabilidad de su recubrimiento de sílice en diferentes medios considerados como fisiológicos. Se eligió como medio más simple una solución salina como es el tampón fosfato salino (PBS) a pH fisiológico de 7.4. Se utilizó también un medio enriquecido utilizado para el crecimiento de cultivos celulares, DMEM, suplementado con suero (FBS), para simular las condiciones en las que se encontrarían las NPs en un cultivo celular. Por último, se preparó un medio lisosomal artificial con pH 4.5 (H. Müller *et al.*, 2010) para simular el entorno salino ácido en el que se encontrarían las NPs internalizadas en las células una vez entrasen mediadas por receptores en la ruta endo-lisosomal. En todos los casos, se incubó una solución de NPs a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, considerada adecuada al haber sido utilizada en otros estudios similares (Braun *et al.*, 2016) y en ensayos previos en nuestro grupo de investigación (Iturrioz-Rodríguez *et al.*, 2019). Se incubaron a 37 °C en agitación suave y se tomaron alícuotas cada 24

h hasta un tiempo total de una semana, para finalmente ser lavadas y evaluar el estado de las NPs mediante TEM.

En la Figura 31 quedan reflejados los resultados de la estabilidad de la capa de sílice amorfa. Se puede apreciar cómo en PBS, tras 24 h, de incubación se aprecian los primeros indicios de degradación, con claras irregularidades en la superficie de la capa. Estos efectos se van haciendo más notorios a medida que aumenta el tiempo de incubación, siendo tras 96 h y una semana muy evidentes, donde la capa de SiO₂ está muy dañada y es complicado encontrar NPs que conserven su morfología esférica inicial.

Algo similar ocurre con el medio de cultivo DMEM suplementado con suero; en este caso, la degradación tiene lugar de manera más rápida todavía, gracias a la presencia de otras sales y compuestos que enriquecen el medio, así como por acción de las proteínas séricas (Hao *et al.*, 2012; S. A. Yang *et al.*, 2018). Prácticamente desde las 24 h se ve cómo la cubierta de SiO₂ se ha degradado y deformado, haciendo que algunas NPs incluso se fusionen. Se ha estudiado cómo la presencia de iones Mg²⁺ y Ca²⁺ aumentan la velocidad de disolución de la sílice y silicatos, lo que también explicaría que la degradación sea más rápida en DMEM que en PBS, al no contener éste los mencionados iones. Además, los iones Na⁺ contribuyen también a la desprotonación de la sílice (Braun *et al.*, 2016).

En el caso del medio lisosomal, el proceso de degradación es radicalmente distinto al producido por los dos medios anteriores. Hasta las 48 h la capa de SiO₂ permanece prácticamente inalterada; es a partir de las 72 h de incubación cuando empieza a apreciarse degradación, pero a diferencia de los otros medios, en este caso tiene lugar desde el interior de la capa hacia el exterior. Se puede advertir el hueco que queda alrededor del núcleo de Fe₃O₄ por la degradación de la sílice en la zona en contacto con dicho núcleo, desplazándose incluso la partícula de su posición central. Sin embargo, la superficie de la NP queda intacta incluso a tiempos largos como una semana, manteniendo la

esfericidad y homogeneidad de la superficie de sílice. Estos resultados pueden explicarse debido a que la solubilidad de la sílice en medios acuosos es altamente dependiente del pH, aumentando drásticamente en condiciones alcalinas debido al aumento de la deprotonación de los grupos silanol y la hidrólisis de los enlaces Si-O-Si catalizada por ataques nucleofílicos de los iones OH^- (Braun *et al.*, 2016). Por el contrario, la disolución en condiciones ácidas es mucho más baja, como ha quedado reflejado en los resultados tras la incubación de las NPs con medio lisosomal. El hecho de que a tiempos largos comience una degradación en el interior de la NP, podría deberse a que el medio hubiese alcanzado la interfase entre el núcleo y la capa de SiO_2 , al no ser ésta totalmente maciza y tener, aunque mínimos, canales porosos. Esta elevada estabilidad en medios ácidos supondría una ventaja añadida si se contempla, por ejemplo, una administración oral de las NPs y, por consiguiente, la exposición de las NPs a un ambiente ácido como el del tracto gastrointestinal.

De cara a su aplicación en terapia o diagnóstico, se puede concluir que este recubrimiento tiene la estabilidad suficiente como para permitir la llegada de las NPs a las células o tejidos diana, puesto que lo esperable y deseable es que lo haga en tiempos cortos de menos de 24 h para ejercer su efecto. Por otra parte, va a tener a la vez la capacidad de ser degradada progresivamente en un producto no tóxico como es el ácido silícico, que favorezca finalmente la eliminación de las NPs por el organismo (Croissant *et al.*, 2017). Como se ha visto en el Apartado 1.7 donde se analizaba la viabilidad de las células tras la exposición a este tipo de NPs, a tiempos largos en los que se asume que parte de la capa se haya degradado y haya cierta exposición del núcleo de algunas NPs al medio celular, la tasa de muerte celular es mínima.

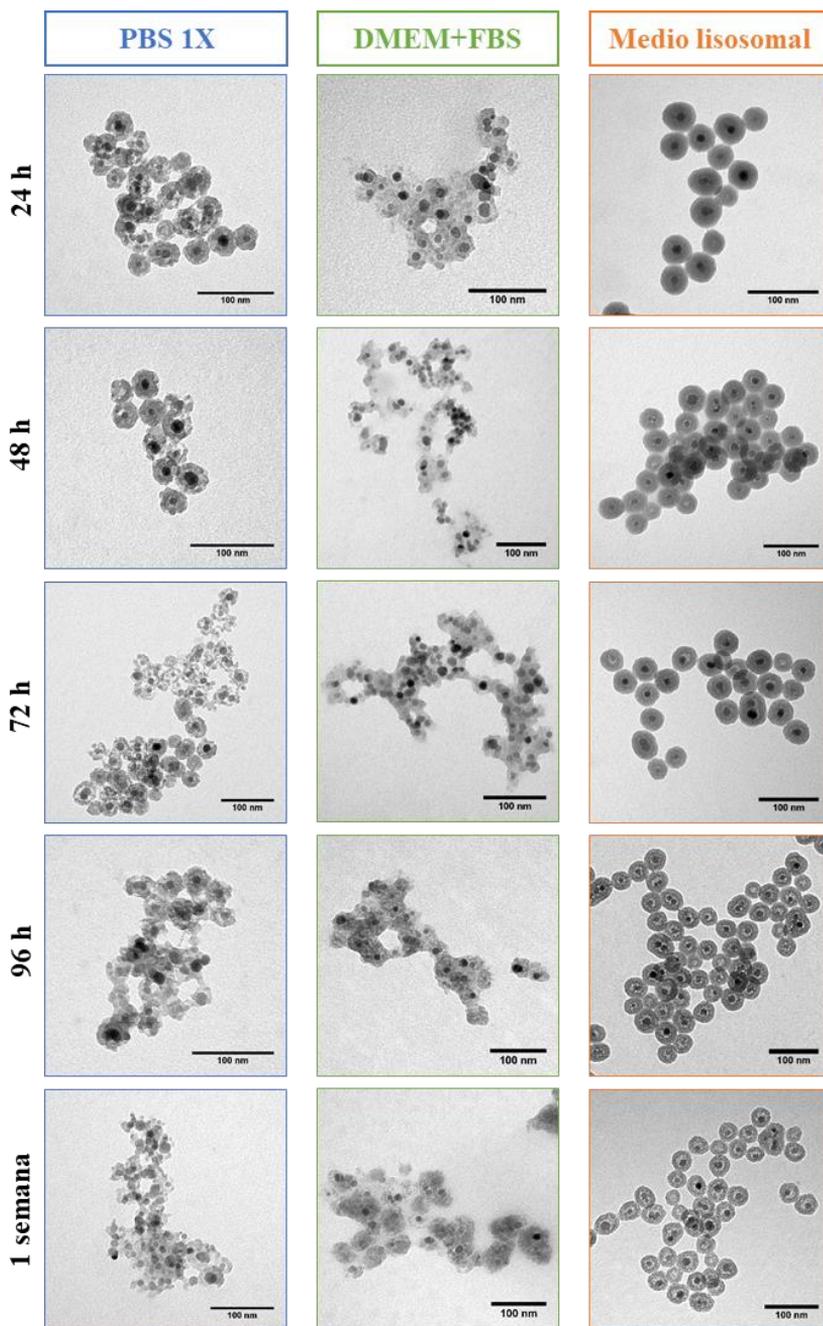


Figura 31. Estudio de la estabilidad del recubrimiento de SiO₂ mediante TEM. Imágenes de las NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC tras las incubaciones a 37 °C en diferentes medios y a diferentes tiempos.

2. Biofuncionalización de NMs con proteínas recombinantes

2.1. Bioconjugación con 6xHis:GFP como prueba de concepto

Como se vio en la Introducción (Apartado 2.5.2.), existen diferentes estrategias para conjugar proteínas o anticuerpos a la superficie de las NPs. Sin embargo, la mayoría presenta diferentes inconvenientes, que pueden ir desde la insuficiente saturación de la superficie con las moléculas de interés, el posicionamiento incorrecto de la molécula quedando poco expuesto el dominio de interacción, la pérdida de la estructura original de la proteína, la pérdida de la proteína ligada, la desnaturalización de ésta y la consecuente activación de la respuesta inmune, etc.

Como parte de los estudios que se han llevado a cabo en esta Tesis, se ha desarrollado un sistema basado en la conjugación de NMs de carga superficial negativa con proteínas a través de una secuencia aminoacídica con carga positiva, demostrando ser un método sencillo a la vez que robusto para solventar los problemas que ofrecen otras estrategias. Como primera prueba de concepto, se utilizó la proteína fluorescente verde (GFP) unida a una secuencia de 6 residuos de histidina (6xHis) en su extremo amino terminal (Figura 32A). Como modelo de nanomaterial se utilizaron partículas de SiO₂ de ~500 nm, con potencial ζ negativo gracias a los grupos hidroxilo que presenta en superficie (Figura 32B). Estas partículas se bioconjugaron mediante sonicación suave (3 ciclos de 2 s) con una solución salina (PBS 1X) de la proteína recombinante en exceso. Gracias a la fluorescencia inherente de la GFP, se puede comprobar a simple vista y con microscopía de fluorescencia la conjugación de 6xHis:GFP con las partículas (Figura 32C-D). La fluorescencia también permite controlar el estado del plegamiento de la proteína para comprobar que no se desnaturalice; en el transcurso de los diferentes experimentos (hasta 72 h) no se observó atenuación o alteración de la

fluorescencia, indicativo de que la proteína mantenía su estado nativo de plegamiento.

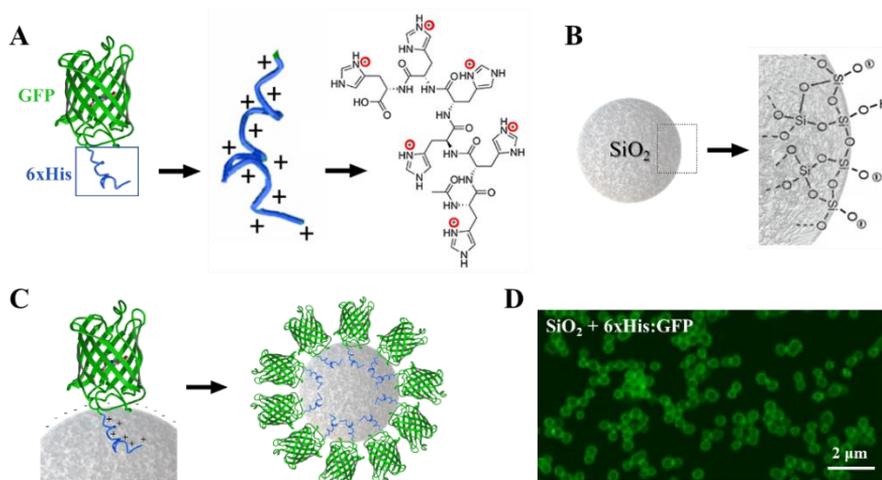


Figura 32. Modelo de conjugación con 6xHis:GFP. (A) Estructura de la proteína recombinante 6xHis:GFP, con una secuencia polipeptídica fusionada de 6 residuos de histidina. Rodeados en rojo aparecen los átomos de N que se van a protonar a pH fisiológico y que van a aportar una carga positiva para la conjugación. (B) Grupos funcionales presentes en la superficie de las partículas de SiO₂. Gracias a los grupos hidroxilo, la superficie tiene una carga superficial negativa. (C) Predicción de la orientación de la proteína recombinante sobre la superficie de las partículas, gracias a la conjugación electrostática entre la carga negativa de la superficie y la secuencia 6xHis positiva de la proteína. (D) Imagen de microscopía confocal de partículas de SiO₂ funcionalizadas con 6xHis:GFP. El halo fluorescente en la superficie de las partículas indica la cobertura con 6xHis:GFP en su forma nativa (no desnaturalizada).

Para demostrar la orientación de la construcción proteica 6xHis:GFP en la superficie de las partículas, es decir, si se cumplía la hipótesis de que la interacción de la proteína con la superficie de la partícula viene mediada principalmente por los residuos de la secuencia de poli-histidina, se llevó a cabo una digestión enzimática (proteólisis) de esta región con la proteasa tripsina (Figura 33A), para la cual esta secuencia de la proteína quimera presentaba varios sitios de corte (ver Materiales y Métodos, Apartado 2.9.1. y Figura 19). En la Figura 33B puede apreciarse como la versión de la proteína GFP tras el procesamiento proteolítico (sin la secuencia de unión a los

nanomateriales), no consigue conjugarse a la superficie de las partículas de SiO₂, al no apreciarse fluorescencia cuando se analizan con microscopía confocal. Para corroborar estos resultados, se realizó también una determinación de la proteína sobre las partículas empleando SDS-PAGE (Figura 33C). A diferencia de la proteína quimera 6xHis:GFP, que se une eficientemente a las partículas (calle 4), la GFP sin la secuencia policatiónica no se une a las partículas (calle 6) y aparece toda la proteína GFP sin conjugar en la banda correspondiente al sobrenadante (calle 5).

Para estudiar la estabilidad de esta unión, se expusieron las partículas de SiO₂ funcionalizadas con 6xHis:GFP a medios con diferentes condiciones de pH entre 5.2 y 9, y diferentes concentraciones de NaCl entre 0 y 1M. Tras 2 h de incubación de las partículas bioconjugadas en dichos medios, se evaluó semicuantitativamente la proteína que seguía unida a las partículas mediante SDS-PAGE. La Figura 34 muestra la elevada estabilidad de la unión de la proteína conjugada a las partículas, incluso durante la exposición de las partículas bioconjugadas a condiciones extremas de pH y sal. El hecho de que a pH mayores que el pK_a de las histidinas (cercano al pH fisiológico), en los que el nitrógeno del anillo de imidazol no estaría protonado y, por tanto, podría perderse la carga que contribuye a la interacción electrostática, indica que existen otro tipo de enlaces y coordinaciones que favorecen la estabilidad de la unión. En el estudio llevado a cabo por Mudunkotuwa, se demuestra que a pH fisiológico, la interacción de histidinas con la superficie de NPs de óxido de titanio, material comparable con el SiO₂, viene dada, además de por interacciones electrostáticas, por enlaces de puente de hidrógeno del grupo amino del anillo imidazol y por interacciones de orbitales π con la superficie de las NPs (Mudunkotuwa & Grassian, 2014).

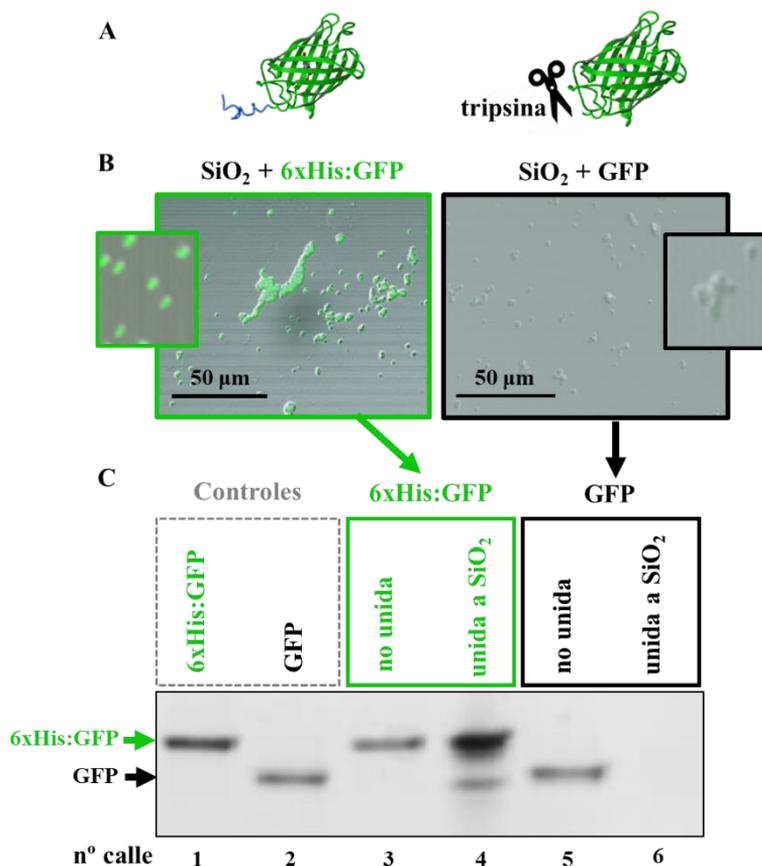


Figura 33. Unión de la proteína quimera a la superficie de las partículas mediada por la secuencia de histidinas. (A) Diagrama del proceso de digestión de la secuencia de 6xHis. (B) Imágenes de microscopía confocal/contraste de fases de partículas de SiO₂ incubadas con 6xHis:GFP (izquierda) y con GFP digerida con tripsina (derecha). No se observa fluorescencia en las partículas incubadas con la versión sin His. (C) Análisis semicuantitativo de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE. Las calles 1 y 2 muestran las proteínas purificadas 6xHis:GFP y GFP, respectivamente, previamente al proceso de conjugación. Las calles 3 y 5 muestran el exceso de proteína no unida tras el proceso de bioconjugación. Las calles 4 y 6 muestran la proteína unida a 50 µg de partículas de SiO₂ tras la incubación. No se detecta proteína sin His en la superficie de las partículas (calle 6), en contraste a la proteína quimera 6xHis:GFP.

Resultados y discusión

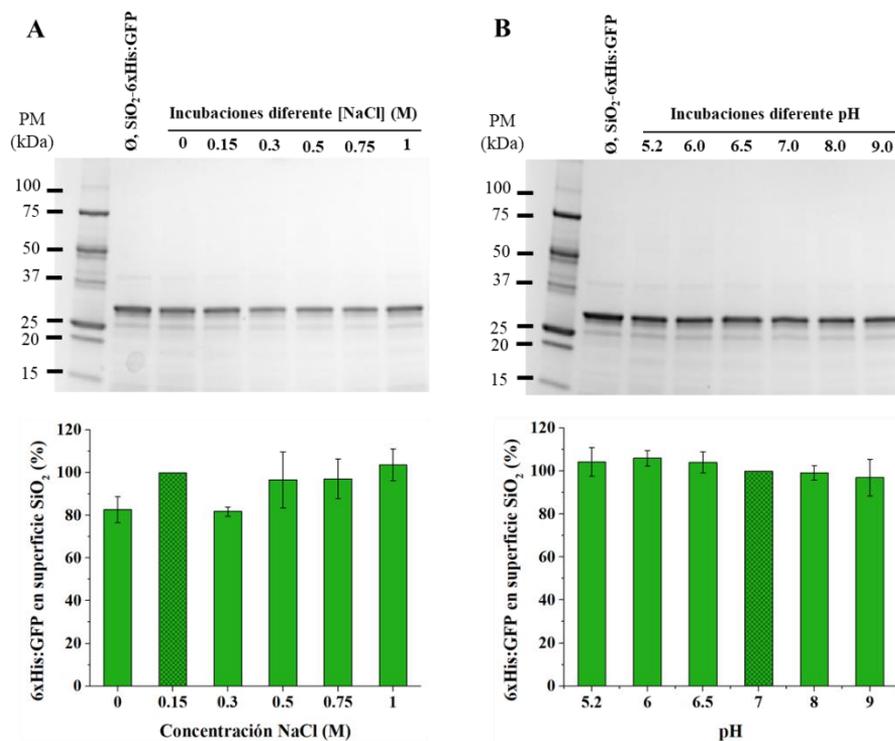


Figura 34. Estabilidad de la biofuncionalización. Análisis mediante SDS-PAGE de la estabilidad de la unión de 6xHis:GFP a la superficie de las partículas tras la exposición durante 2 h a diferentes (A) pHs (5.2, 6, 6.5, 7, 8, 9) o (B) concentraciones de sal (0, 0.15, 0.3, 0.5, 0.7, 1M NaCl). Los datos semicuantitativos de 3 réplicas experimentales independientes aparecen en las correspondientes gráficas de debajo, expresados en relación a las condiciones fisiológicas (pH 7 y NaCl 0.15 M).

La estabilidad de la unión también se estudió en términos de exposición a un entorno fisiológico, ya que al incubar las partículas biofuncionalizadas en un medio salino con proteínas séricas (FBS) a 37 °C, el intercambio de la 6xHis:GFP conjugada con proteínas del suero era mínima, especialmente a tiempos cortos de incubación (Figura 35A). Después de 24 h, más del 90% de la proteína unida en la superficie de las partículas era todavía 6xHis:GFP, e incluso a tiempos más largos como 72 h, solo un 20% de proteínas séricas se había intercambiado con 6xHis:GFP. Esto resulta de suma importancia para que las NPs mantengan su cubierta proteica de direccionamiento el tiempo

suficiente para que puedan llegar a las células de interés, a la vez que no se incorporen otras proteínas que puedan hacer que se unan a receptores más promiscuos presentes en todas las células. En esta línea, se procedió a realizar una prueba en cultivos celulares para comparar la interacción de partículas de SiO₂ funcionalizadas con 6xHis:GFP con la interacción de partículas funcionalizadas de manera espontánea con las proteínas del suero presentes en el medio de cultivo. Tras 2 h de exposición, en el caso de la cubierta de proteínas séricas, ésta provoca la entrada de las partículas en las células HeLa al poseer receptores para dichas proteínas (Figura 35B), mientras que la funcionalización con 6xHis:GFP previene la internalización al no presentar las células receptores específicos para la GFP (Figura 35C). Esto apoya de nuevo la elevada estabilidad de la cobertura proteica basada en la estrategia diseñada, ya que previene o retarda muy significativamente el “*biofouling*”, resultado del intercambio con otras proteínas que podrían desencadenar una endocitosis no específica.

Este modelo, además de estable, es de gran versatilidad, ya que la secuencia de histidinas puede en principio fusionarse a cualquier proteína o dominio de interés que permita dirigir selectivamente a determinados tipos celulares.

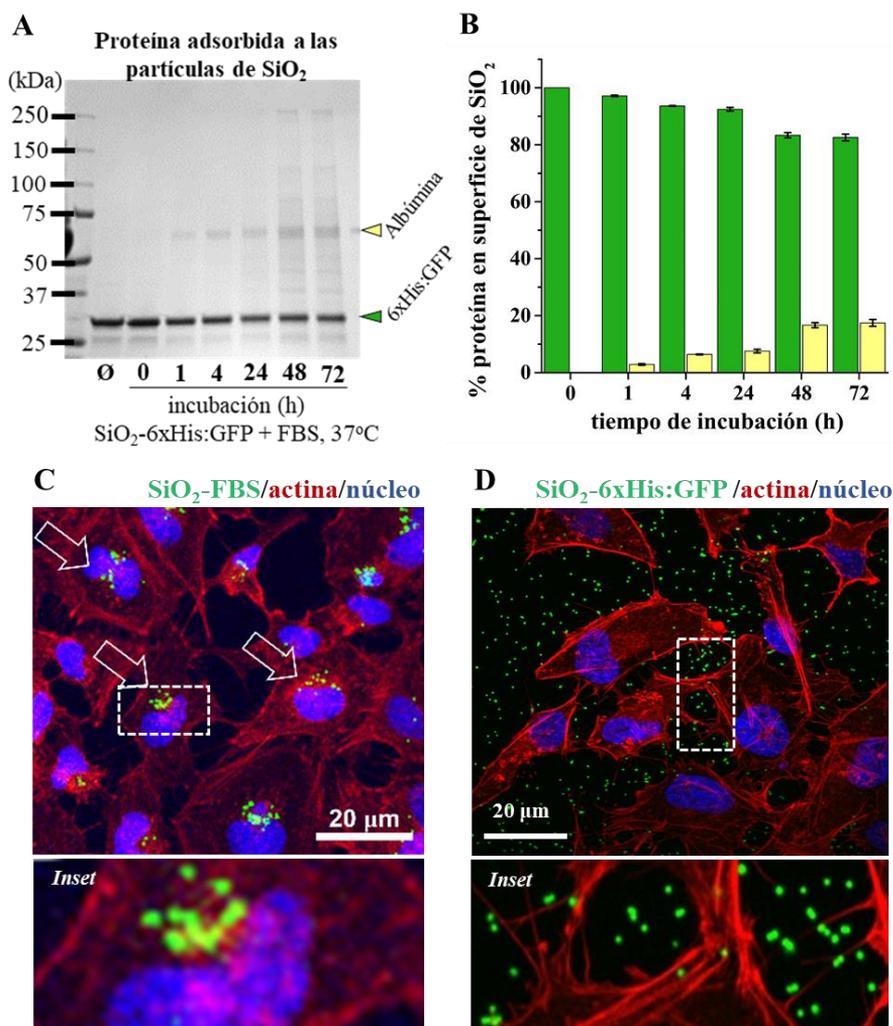


Figura 35. Estabilidad de la cubierta proteica ante la exposición a condiciones fisiológicas. (A) Análisis mediante SDS-PAGE del recubrimiento proteico de 50 µg de partículas de SiO₂ conjugadas con 6xHis:GFP tras ser expuestas a condiciones fisiológicas simuladas durante 0, 1, 4, 24, 48 y 72 h a 37 °C. (B) Cuantificación del porcentaje de 6xHis:GFP (barras verdes) frente a las proteínas del suero (barras amarillas) que hay unidas a la superficie de las partículas a cada tiempo de incubación. Los valores se muestran como la media y las barras de error hacen referencia a la desviación estándar (DE) de 3 réplicas experimentales. (C) Imagen de microscopía confocal de células HeLa incubadas durante 2 h con partículas de SiO₂ funcionalizadas con proteínas séricas conjugadas a FITC (canal verde). Al existir receptores para estas proteínas, las células internalizan las partículas. Por el contrario, al carecer de receptores para GFP, la mayoría de partículas funcionalizadas con 6xHis:GFP se localizan en el exterior celular (D), sin haber interactuado con éstas. El córtex celular (actina) se tiñó con Faloidina-TRITC (canal rojo) y los núcleos con Hoechst (canal azul).

2.2. Biofuncionalización con STxB:6xHis

Los resultados obtenidos a partir de la prueba de concepto con la construcción 6xHis:GFP dieron paso a la aplicación del sistema de conjugación para el desarrollo de una proteína quimera que sirviese para poder biofuncionalizar NMs y dirigirlos específicamente a células tumorales, en este caso de CCC. Como alternativa a los ligandos convencionales, las toxinas resultan de interés al haber sido seleccionadas evolutivamente para unirse con gran afinidad a sus receptores diana. Este es el caso de la toxina Shiga bacteriana, capaz de unirse a su receptor, Gb3, y entrar en las células por una vía no-canónica evitando los lisosomas, lo que la hace todavía más interesante. Como se verá a continuación, en este trabajo se ha diseñado una proteína quimera constituida por el dominio de interacción de la toxina Shiga fusionado a una secuencia de 6 histidinas, como ligando para dirigir al receptor Gb3, sobreexpresado en tumores de CCC.

2.2.1. Sobreexpresión y purificación de STxB:6xHis

Para la obtención del ligando de interés, primero se seleccionó la secuencia de ADN correspondiente a uno de los monómeros que comprenden el homopentámero de la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), encargado de mediar la unión con el receptor Gb3 (Figura 36A). Así, se descartó la secuencia correspondiente a la subunidad catalítica de la toxina. A esta secuencia seleccionada se añadió otra codificante para 6 residuos de histidinas, obteniendo así una secuencia final para poder obtener la proteína de fusión denominada como STxB:6xHis. Esta secuencia de ADN fue sintetizada y clonada en el vector pET-15b; en la Figura 36B se muestra la secuencia proporcionada por la empresa encargada del proceso de clonación, que demuestra la correcta inserción de la secuencia de STxB en el vector para su correcta lectura y posterior traducción en la proteína final, que queda reflejada en la Figura 36C. Se transformaron bacterias BL21(DE3)pLysS competentes

Resultados y discusión

con la construcción clonada para sobreexpresar en ellas la proteína quimera y posteriormente purificarla.

La Figura 36D recoge un gel de electroforesis SDS-PAGE con las fracciones del proceso de sobreexpresión en bacterias, así como la posterior extracción y purificación de la proteína recombinante. Se puede apreciar que tras la inducción de la expresión de proteína con IPTG durante un período de unas 12 horas a temperatura ambiente (calle 2), aparece la banda correspondiente a STxB:6xHis, de un tamaño de 10.7 kDa, que en el control de bacterias sin inducir no aparece. Una vez sobreexpresada, se realizó una lisis de la pared bacteriana, tanto enzimática como física, para recoger en la fracción soluble la proteína de interés (calle 5) y así proceder a su purificación. En las calles 6 a la 8, aparecen las diferentes fracciones del proceso de purificación en columna de cromatografía, gracias a que la construcción proteica contiene una secuencia de 6 histidinas con gran afinidad por el níquel. Se observa cómo en las fracciones de proteína no unida a la columna (calle 6) y del lavado de la columna (calle 7) aparecen todas las proteínas bacterianas que se descartan al no tener afinidad por la resina; aparece una pequeña cantidad de la proteína de interés por saturación de la columna. Finalmente, en la fracción que se recoge tras la adición del tampón con imidazol (calle 8), aparece únicamente la proteína de interés, purificada. Se cargó también para su chequeo una muestra tras el paso de la proteína purificada por una columna de desalinización PD-10, empleada para eliminar el imidazol de la solución de la proteína (calle 9). Gracias a este método, se puede obtener gran cantidad de proteína purificada de forma sencilla y reproducible para la posterior funcionalización de los NMs, además de ser una estrategia más económica si se compara por ejemplo con el uso de anticuerpos u otros péptidos comerciales.

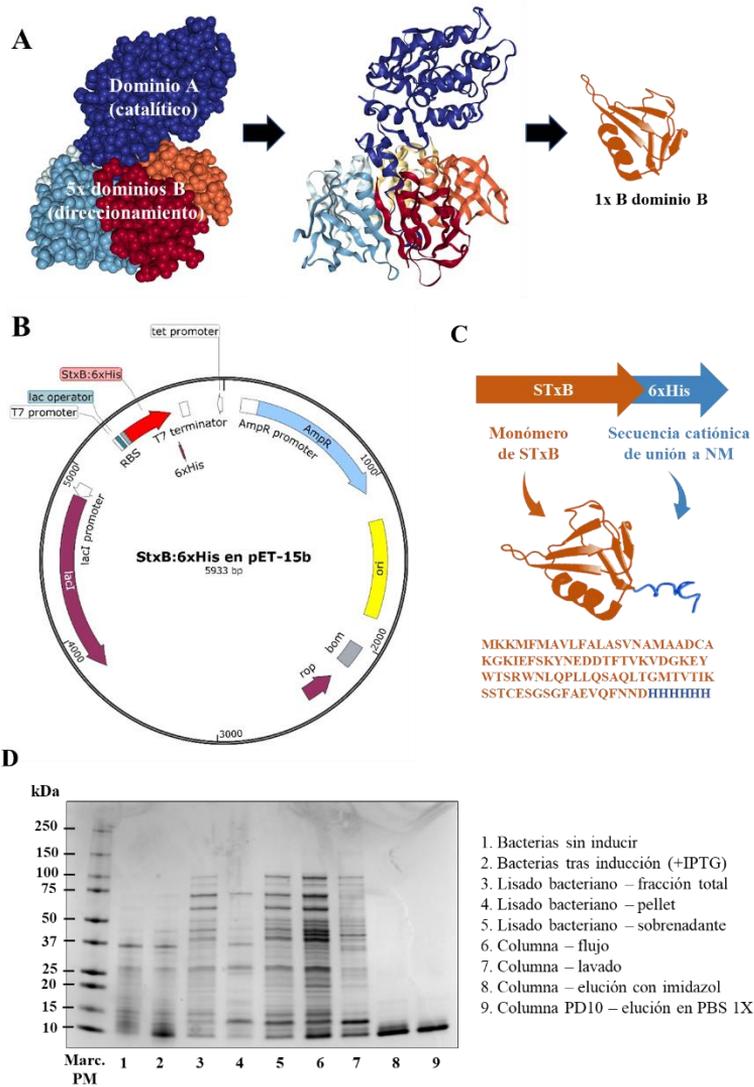


Figura 36. Construcción STxB:6xHis. (A) Esquema del diseño, basado en la selección de la secuencia de uno de los monómeros de la subunidad STxB, a la que se fusionó la secuencia de 6xHis. (B) La construcción STxB:6xHis fue sintetizada y clonada en el vector pET-15b. La secuencia correspondiente a STxB:6xHis (en rojo) se encuentra bajo la inducción del promotor T7 y el operador *lac*. Se muestran también otras secuencias características del vector, como el gen de resistencia a ampicilina (en azul) o en gen del represor *lacI* para evitar la producción de proteína en ausencia de IPTG. Figura del vector generada con el programa *SnapGene*. (C) Esquema de la proteína resultante, con su correspondiente secuencia aminoacídica. (D) Análisis mediante SDS-PAGE del proceso de sobreexpresión y purificación de la proteína STxB:6xHis. A la derecha se enumera el contenido cargado en cada calle del gel.

2.2.2. Conjugación de diferentes NMs con STxB:6xHis

Siguiendo el mismo protocolo que en la funcionalización de NPs de SiO₂ con 6xHis:GFP (Apartado 2.1.), se bioconjugaron partículas de SiO₂ de ~500 nm, así como las sintetizadas de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC y AuNRs@SiO₂-RBITC (esquema en Figura 37A), con el complejo proteico STxB:6xHis mediante sonicación suave (3 ciclos de 2 s) en un tampón fisiológico, PBS 1X. La Figura 37B muestra los resultados de la electroforesis SDS-PAGE donde se comprueba que el complejo proteico STxB:6xHis purificado (calle 1) se une a todos los NMs testados (calles 2 a 4). Mediante microscopía confocal y fusionando el fluoróforo FITC al complejo proteico STxB:6xHis, se obtuvieron imágenes de fluorescencia donde se comprobó el recubrimiento proteico de la superficie de las partículas de SiO₂ (Figura 37C), confirmando de nuevo la bioconjugación y la saturación de la superficie con las proteínas. Se ha elegido mostrar las imágenes en este tipo de partículas al tener un mayor tamaño y poder apreciarse la cubierta en partículas individualmente, algo que la resolución del microscopio confocal no permite para el resto de NMs utilizados. Con estos resultados, consistentes con lo visto con la conjugación del modelo 6xHis:GFP, se confirma de nuevo la eficacia del método basado en la funcionalización de NMs con superficie negativa a través de una cola aminoacídica catiónica, consiguiendo saturar la superficie de las NPs con la proteína de interés.

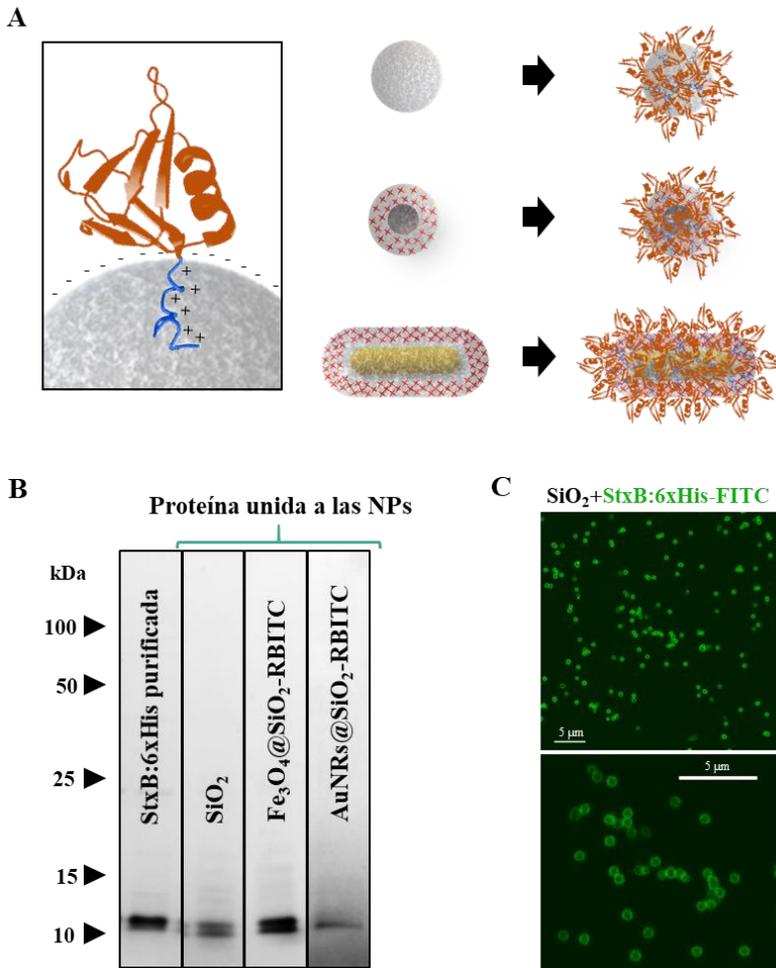


Figura 37. Funcionalización de nanomateriales con STxB:6xHis. (A) Modelo de la orientación y unión de la proteína sobre la superficie de los diferentes NMs empleados. (B) Análisis por SDS-PAGE de la proteína unida a la superficie de las diferentes NPs con SiO₂: SiO₂ de 500 nm (calle 2), Fe₃O₄@SiO₂-RBITC (calle 3) y AuNRs@SiO₂-RBITC (calle 4). En la calle 1 se muestra la proteína STxB:6xHis purificada con la que se han funcionado los distintos NMs. (C) Imagen de microscopía confocal de partículas de SiO₂-500 nm funcionalizadas con STxB:6xHis previamente conjugada al fluoróforo FITC. Se aprecian un halo fluorescente verde en la superficie de las partículas demostrando su recubrimiento con la proteína.

3. Especificidad de los NMs biofuncionalizados con STxB:6xHis por el receptor Gb3

3.1. Análisis de la expresión del receptor Gb3 en células Detroit 562

La globotriosilceramida (Gb3), el receptor de la toxina Shiga, está sobreexpresado en numerosos tumores, especialmente del tracto gastrointestinal (Falguieres *et al.*, 2008; Geyer *et al.*, 2016; Johansson *et al.*, 2009; Kovbasnjuk *et al.*, 2005; Stimmer *et al.*, 2014). Se trata de un glucoesfingolípido, una molécula anfipática compuesta por una parte hidrófoba formada por ceramida, embebida en la bicapa lipídica de la membrana celular, y por un oligosacárido, cadena de carácter hidrófilo y expuesta a la superficie celular para la interacción con su ligando, la toxina Shiga. Se ha descrito también una sobreexpresión de este receptor y otros glicoesfingolípidos de la familia en tumores de cabeza y cuello (Bolot *et al.*, 1998; Filho *et al.*, 2015), si bien los estudios son más reducidos y desactualizados. Por ello, resulta de interés ampliar los datos de expresión tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes, ya que puede suponer una diana terapéutica de gran atractivo para este tipo de tumores.

En este trabajo, se ha decidido trabajar como modelo con la línea celular Detroit 562, línea inmortalizada derivada de un tumor faríngeo humano, para conocer el patrón de expresión de Gb3 y la aplicabilidad de nanoterapias dirigidas a dicho receptor. La Figura 38 recoge imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células Detroit 562 teñidas con un anticuerpo específico anti-Gb3. Para visualizar mejor la distribución del receptor Gb3 en la membrana celular, se realizó una inmunotinción de las células vivas a 4 °C, ya que una tinción en células fijadas y permeabilizadas permitiría observar además los receptores presentes en el interior de la célula al alterarse la estructura de las membranas con el procesado. En la Figura 38 puede apreciarse que la expresión de Gb3 no es homogénea en todas las células; si bien la gran mayoría parecen tener cierta expresión del receptor (canal rojo),

claramente hay determinadas células que presentan unos niveles mayores de expresión. Tampoco presenta una distribución homogénea en toda la membrana de la célula. Este patrón puede asociarse a la distribución de Gb3 en forma de cúmulos en regiones de la membrana plasmática conocidas como *lipid rafts* o balsas lipídicas, dominios conformados por el ensamblaje de esfingolípidos, colesterol y glicosilfosfatidilinositol (C. A. Lingwood *et al.*, 2010). Esta asociación de Gb3 en balsas lipídicas es determinante para la posterior ruta intracelular de STx, ya que van a ser la organización y clasificación de los lípidos de membrana los que determinen la ruta intracelular, y no una secuencia que porte la toxina, a diferencia de la mayoría de proteínas (Devenica *et al.*, 2011; Lencer & Saslowsky, 2005). También va a influir en la unión de STx, así como en su destino final, la longitud de la cadena de ácidos grasos del receptor, así como de su estado de saturación (Melton-Celsa, 2014).

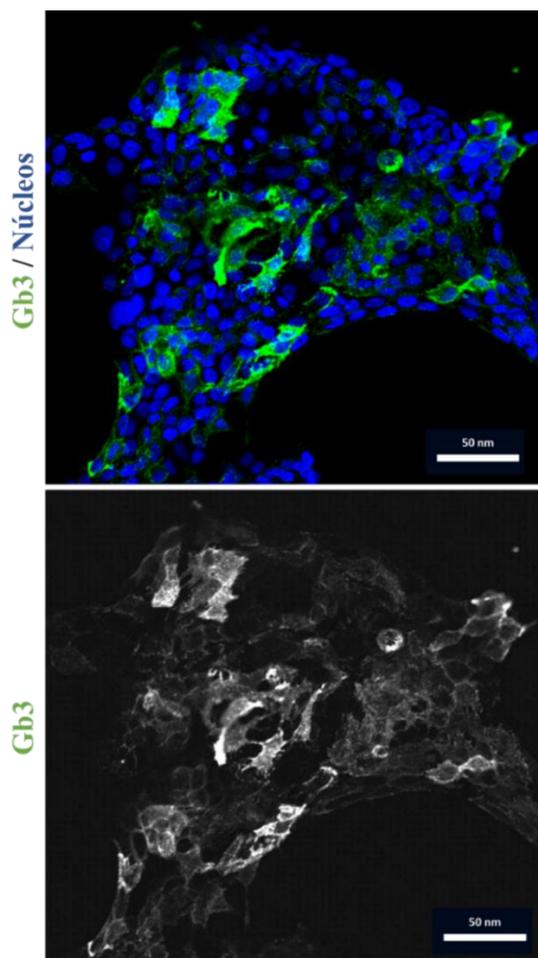


Figura 38. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de una inmunotinción del receptor de membrana Gb3 realizada en células Detroit 562 vivas. El receptor Gb3 se tiñó con un anticuerpo específico (canal verde) y los núcleos fueron teñidos con Hoechst (canal azul).

3.2. Análisis de la interacción de los NMs funcionalizados con el receptor Gb3

La toxina Shiga, o en su defecto la subunidad B de ésta, en células que expresan el receptor Gb3, desencadenan una interacción STxB-Gb3 que promueve un reclutamiento de más receptores a las balsas lipídicas (*clustering* de receptores) para promover una mayor interacción y/o aumentar la cantidad de subunidades STxB que se unen. Tras la unión, se produce la endocitosis de STxB vía ruta

retrógrada, es decir, de la membrana plasmática a Golgi y retículo endoplásmico (RE) (Johannes & Popoff, 2008; Sandvig *et al.*, 2010). Este mecanismo de entrada a las células mediado por receptores es no canónico, pues no sigue la ruta endo-lisosomal típica para casi todas las moléculas/partículas capturadas a través de receptores. Esta nueva ruta de entrada de NMs en las células ofrece muchas ventajas ya que es en los lisosomas donde se suelen inactivar muchas terapias y destruir los nanomateriales.

Sin embargo, no se conoce si la funcionalización de un nanomaterial con STxB provoca el mismo efecto que la toxina, ni si el método de conjugación en la superficie del NM mediante la secuencia 6xHis influye de alguna forma en la interacción proteína-receptor. Por ello, se procedió a analizar mediante técnicas de microscopia confocal de alta resolución y espectroscopía confocal la interacción de las partículas recubiertas con la proteína quimera STxB:6xHis con los receptores Gb3 en células Detroit 562 vivas. Como primera prueba de concepto, las células Detroit 562 se mantuvieron en condiciones estándar y se incubaron durante 24 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de las partículas de SiO_2 funcionalizadas, para ser posteriormente fijadas y teñidas. En la Figura 39 se puede comprobar cómo todas las partículas bioconjugadas (en verde), tras 24 h de incubación, se localizan en el interior de las células en las regiones teñidas del receptor Gb3 (rojo). Analizando el espectrograma de fluorescencia de una partícula (marcada con flecha blanca), se comprueba de nuevo la coincidencia de los dos espectros, quedando patente la co-localización de las partículas funcionalizadas con el receptor. Se puede afirmar por tanto que las NPs han entrado a las células a través de la interacción específica con el receptor de STxB.

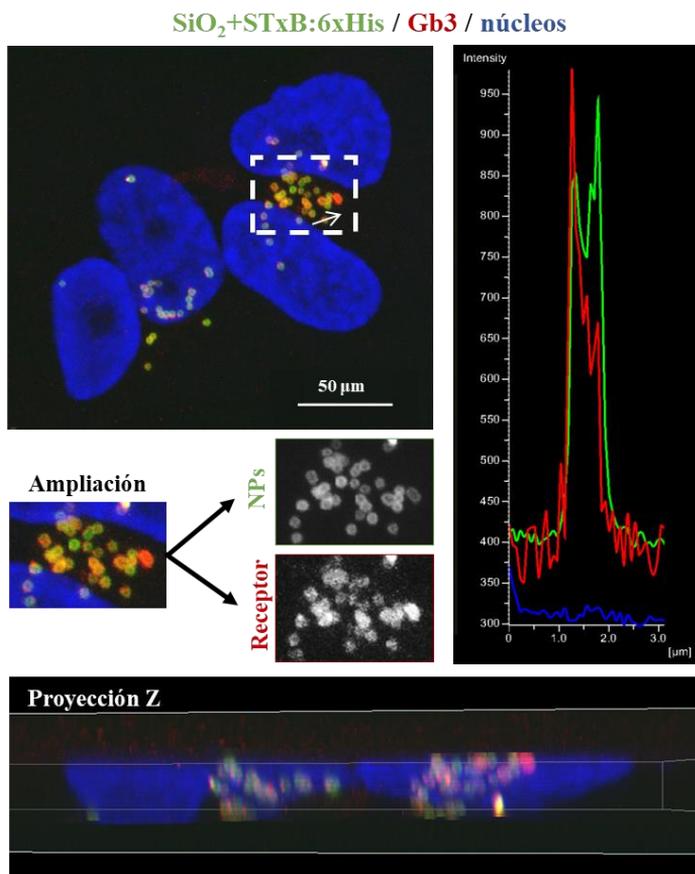


Figura 39. Especificidad de las partículas funcionalizadas con STxB:6xHis por el receptor Gb3. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células Detroit 562 incubadas con partículas de SiO₂ funcionalizadas con STxB:6xHis (canal verde) durante 24 h. Se realizó la inmunotinción para el receptor Gb3 (canal rojo). La ampliación muestra la co-localización de las partículas en receptores que han formado clusters. El espectrograma (derecha) correspondiente a la flecha blanca incluida en la ampliación demuestra la co-localización de la fluorescencia correspondiente al receptor Gb3 (rojo) y una partícula funcionalizada (verde). Abajo se muestra una proyección en Z de las mismas células, donde también se puede apreciar la interacción partículas-receptor y su distribución alrededor y sobre el núcleo de la célula.

Este efecto también fue observable cuando se hizo una comparativa de la distribución de partículas recubiertas, por un lado, con proteínas séricas conjugadas con FITC (Figura 40A), frente a partículas con STxB:6xHis también conjugada con FITC (Figura 40B). Tras 1 h de incubación, las partículas recubiertas de proteínas séricas aparecen en el medio extracelular o

se distribuyen aleatoriamente en las células, pero no coinciden con los receptores Gb3, indicando que el mecanismo de entrada es distinto (Figura 40A). Por el contrario, las partículas recubiertas con STxB:6xHis se observaron de nuevo interaccionando con los receptores Gb3 (Figura 40B). Además, se pueden distinguir células en división que expresan el receptor (flecha roja), pero sin embargo no contienen partículas, debido a que durante la mitosis la célula no puede realizar endocitosis (Fielding *et al.*, 2012), teniendo así un ejemplo de control negativo.

Tras esta primera prueba de concepto con partículas de SiO₂ de 500 nm que permitieron una mejor visualización de la interacción con el receptor en células, se realizaron estudios similares con los principales NMs desarrollados en este trabajo. En la Figura 41, se muestra la distribución de NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC biofuncionalizadas con STxB:6xHis en células Detroit 562 tras diferentes tiempos de exposición. Desde tiempos cortos como 30 min, ya se aprecia cómo las NPs se tienden a ir localizando en las regiones periféricas de los característicos islotes o colonias en los que crece la línea celular, indicando una posible interacción en las zonas con los receptores más expuestos. A tiempos más largos (4 h), ya se aprecian más NPs en el interior de las células.

Tras comprobar la entrada en las células, se procedió a estudiar si, como en el caso de las partículas de SiO₂, esta entrada se debía a interacciones específicas con el receptor Gb3. En la Figura 42 puede verse cómo prácticamente la totalidad de las NPs co-localizan perfectamente con Gb3 en las células tras una exposición de 24 horas. También puede advertirse que en aquellas células que no presentan expresión del receptor, no hay internalizadas NPs, sirviendo como un control negativo que indica la selectividad de las NPs funcionalizadas por el receptor Gb3.

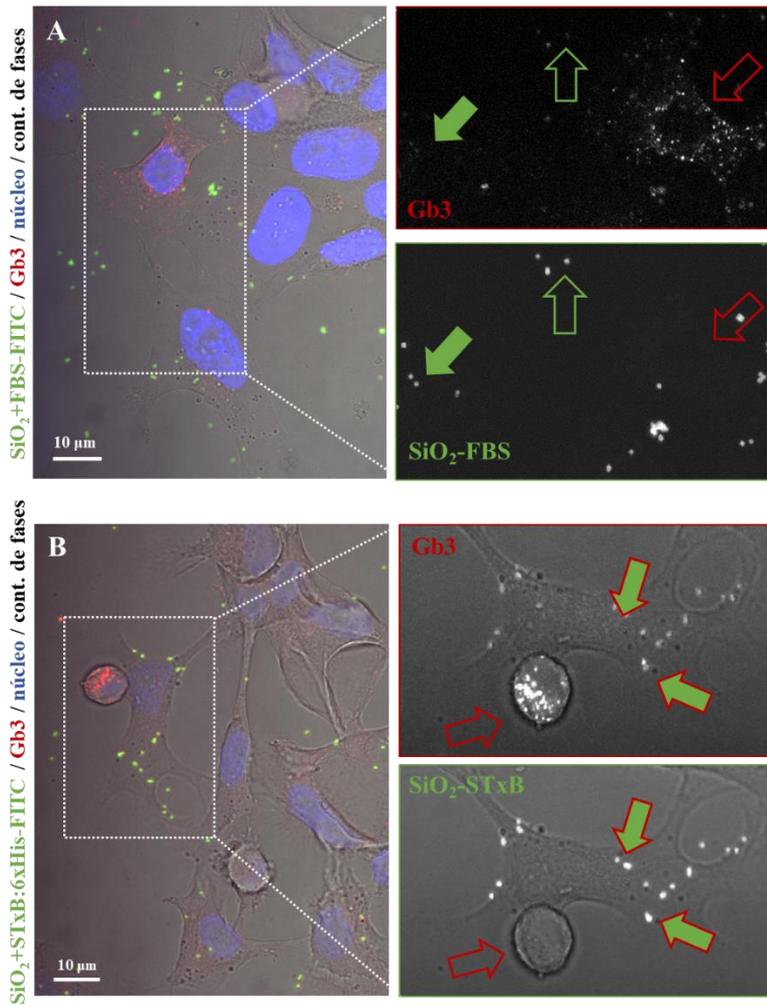


Figura 40. Los NMs funcionalizados con STxB:6xHis interactúan con los receptores Gb3. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal y contraste de fase de cultivos celulares de Detroit 562 incubados durante 1 h con partículas de SiO₂ funcionalizadas bien con proteínas séricas (A) o con STxB:6xHis (B), en ambos casos conjugadas las proteínas a FITC para su visualización. Los receptores Gb3 se tiñeron con un anticuerpo específico (rojo), los núcleos con Hoechst (azul), y el contorno celular se observa en contraste de fases. Las partículas funcionalizadas con proteínas séricas (A) aparecen en su mayoría en el espacio extracelular (flechas verdes vacías) o distribuidas aleatoriamente en las células (flechas verdes rellenas), independientes de Gb3 (flechas rojas). Por el contrario, las partículas con STxB:6xHis (B) interactúan claramente con Gb3 (flechas verdes con contorno rojo). Como control negativo, puede verse una célula con expresión de Gb3 en división que, al no poder endocitar durante la mitosis, no contiene partículas (flecha roja).

Cuando se funcionalizaron AuNRs@SiO₂-RBITC y se añadieron a las células se obtuvieron los mismos resultados. En la Figura 43 puede verse de nuevo una perfecta co-localización con el receptor, apreciándose muy bien en este caso la interacción en la zona de membrana con el característico *clustering* del receptor en torno a los AuNRs, indicativo de un reconocimiento de superficie y reclutamiento de más receptores para la posterior invaginación de membrana y endocitosis.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la proteína recombinante STxB:6xHis se une a la superficie de los distintos NMs de manera orientada y accesible para una interacción correcta con el receptor Gb3 en células, dando lugar a un sistema específico y activo para dirigir selectivamente a células tumorales con expresión de Gb3. Una vez internalizados, por la multifuncionalidad del nanosistema, podría utilizarse como agente dual para terapia y diagnóstico (teragnóstico).

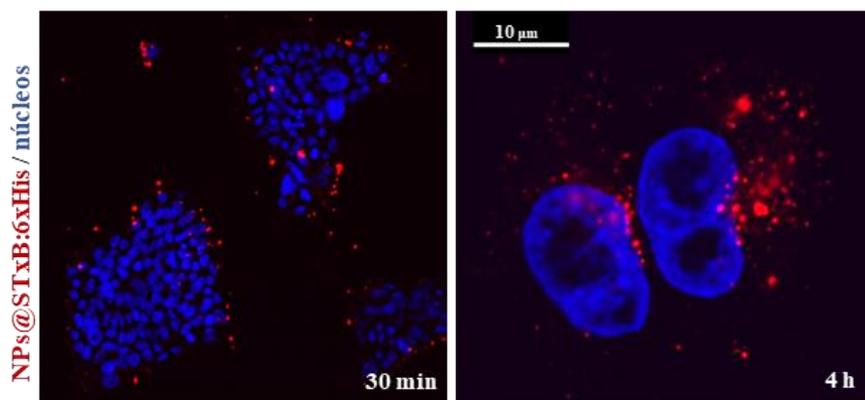


Figura 41. Interacción de las NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC funcionalizadas con STxB:6xHis con células Detroit 562. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células Detroit 562 incubadas durante 30 min (izquierda) o 4 h (derecha) con 5 µg/ml de las NPs sintetizadas Fe₃O₄@SiO₂-RBITC (canal rojo). Tras la exposición, las células fueron fijadas y teñidas con Hoechst para visualizar los núcleos (canal azul).

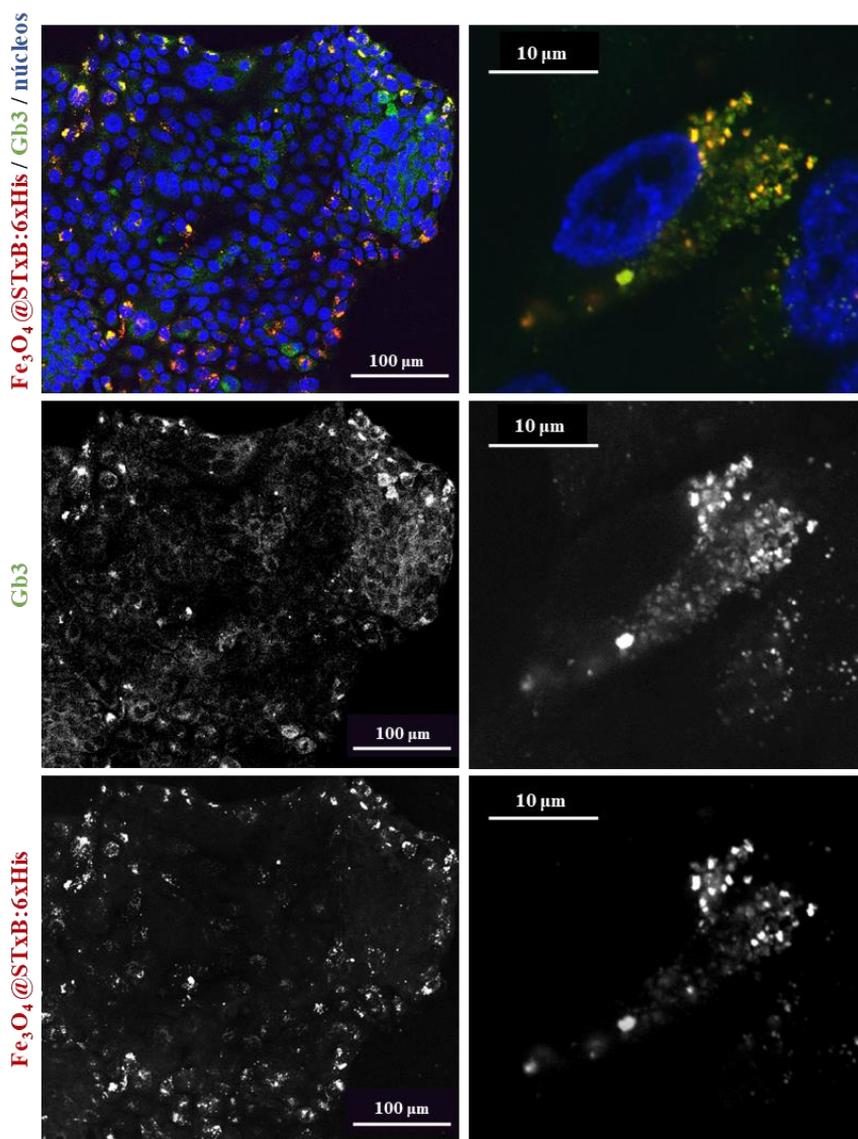


Figura 42. Estudio de la co-localización de NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC funcionalizadas con STxB:6xHis con el receptor Gb3. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células Detroit 562 incubadas durante 24 h con partículas de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC funcionalizadas con STxB:6xHis (canal rojo). Se realizó la inmunotinción para el receptor Gb3 (canal verde), y los núcleos se tiñeron con Hoechst (canal azul). En estas proyecciones Z se aprecia una clara co-localización entre NPs y receptor (color amarillo/naranja).

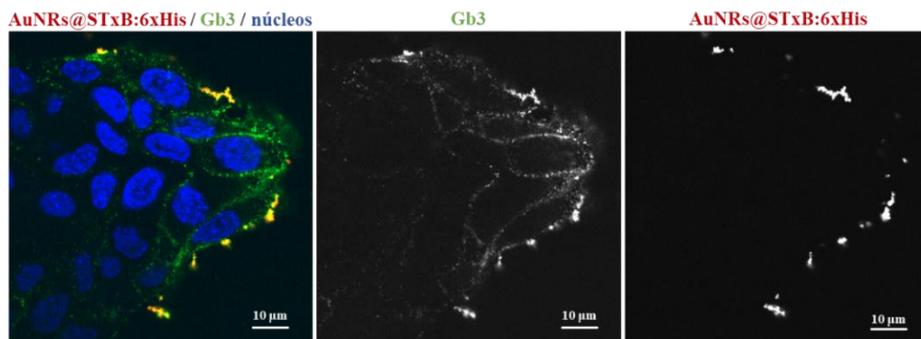


Figura 43. Co-localización de AuNRs@SiO₂-RBITC funcionalizados con STxB:6xHis con el receptor Gb3 en la superficie celular. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células Detroit 562 incubadas durante 1 h con AuNRs@SiO₂-RBITC funcionalizadas (canal rojo). Se realizó la inmunotinción para el receptor Gb3 (canal verde), y los núcleos se tiñeron con Hoechst (canal azul). La colocalización entre AuNRs y receptor aparece en color amarillo/naranja.

Por un lado, podría emplearse para el diagnóstico de precisión *in situ*, ya que la fluorescencia de los NMs va a permitir su detección tras unirse a células que sobreexpresen Gb3 al ser iluminadas con luz azul o verde. En el caso de tumores de cabeza y cuello, anatómicamente accesibles, podría utilizarse una técnica como la fibra óptica de tipo endoscopia. Gracias a esta técnica, Janssen *et al.* consiguieron detectar en ratones *in vivo* STxB conjugada con fluoresceína que, tras su inyección intravenosa o administración oral, se acumulaba de manera espontánea y específica en adenocarcinomas digestivos con sobreexpresión de Gb3, mientras que el tejido no tumoral permanecía sin teñir (Janssen *et al.*, 2006). En CCC podría utilizarse una técnica similar para la visualización directa de las regiones teñidas. Con un estudio de cribado previo de muestras de pacientes que permitiesen hacer una evaluación de la expresión de Gb3 en función del estadio y del grado de diferenciación de las células tumorales, el direccionamiento de este tipo de nanosistemas funcionalizados con STxB, supondría una ayuda en el diagnóstico temprano (imprescindible en este tipo de tumores) a modo de cribado, e incluso en la delimitación de la región a diseccionar (límites quirúrgicos), un problema

actual en la cirugía de resección de este tipo de tumores. Con las propiedades añadidas que aportan los NMs empleados en este trabajo, el diagnóstico podría complementarse también con técnicas como la imagen por resonancia magnética (MRI).

Por otra parte, los NMs diseñados en este trabajo, ofrecen la posibilidad de realizar un tratamiento simultáneo de la zona de interés; en este caso, al haberse escogido NMs con la capacidad de calentarse ante la irradiación con un láser NIR (ver Resultados, Apartado 4), se podría tratar mediante hipertermia la zona afectada, de nuevo tópicamente gracias a la accesibilidad de los tumores de CCC.

3.3. Análisis del mecanismo de entrada y la localización subcelular de los NMs funcionalizados con STxB

Como ya se ha introducido previamente, la toxina Shiga tiene la particularidad de que, tras interactuar en la membrana con el receptor Gb3, desencadena una gran actividad de membrana que acaba englobando a la toxina alcanzando el retículo endoplásmico (RE) por una ruta de transporte retrógrado vía endosomas tempranos y de reciclaje, y aparato de Golgi. Gracias a esta vía retrógrada no canónica, evita la ruta lisosomal y el correspondiente ambiente degradativo de los lisosomas (Johannes & Popoff, 2008; Melton-Celsa, 2014; Sandvig *et al.*, 2010). En la Figura 44 se muestra un esquema con la ruta de entrada propuesta para los NMs funcionalizados con STxB. Está descrito en la literatura que la subunidad B por sí sola también sigue la misma ruta intracelular no-canónica (Luginbuehl *et al.*, 2018).

Tras haber demostrado en el anterior apartado la interacción de los diferentes NMs funcionalizados con STxB con el receptor Gb3, se procedió a analizar si también seguían la ruta no-canónica intracelular. En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo en células vivas Detroit 562 incubadas con NPs de Fe₃O₄@SiO₂-RBITC funcionalizadas, empleando microscopía confocal de

fluorescencia y una tinción con una sonda *LysoTracker*[®], altamente selectiva por orgánulos ácidos como son los lisosomas. En la Figura 45 se compara la co-localización de las NPs (canal rojo), bien funcionalizadas con proteínas séricas o con STxB, con la de los lisosomas (canal verde). Mientras que prácticamente todas las NPs funcionalizadas con proteínas séricas co-localizan con lisosomas (Figura 45A), las NPs con STxB:6xHis se distribuyen en compartimentos celulares diferentes (Figura 45B). En este mismo experimento, se pudo apreciar un peculiar comportamiento de la membrana celular en la captación de estas NPs, formando estructuras tubulares.

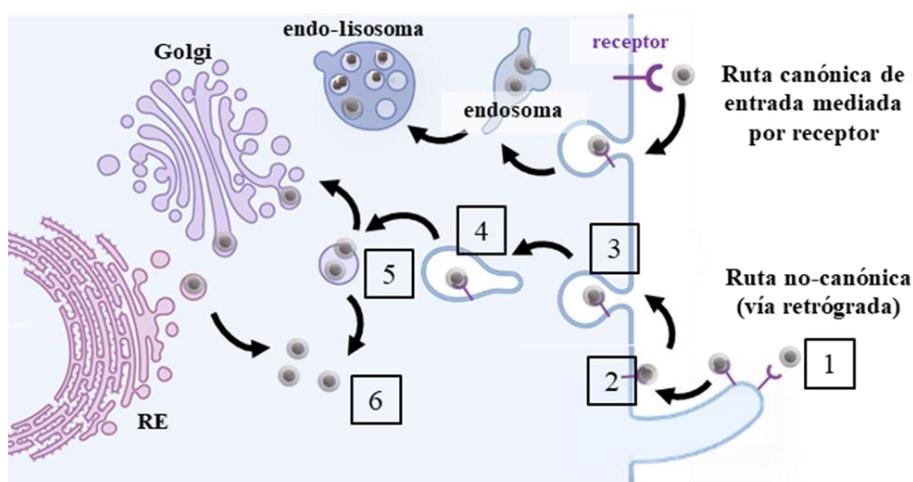


Figura 44. Esquema comparativo del mecanismo de entrada vía retrógrada frente al mecanismo canónico por la ruta endo-lisosomal. La mayoría de NPs funcionalizadas con proteínas entran en las células por una ruta canónica mediada por receptor, en el que las NPs van a ir vía-endo-lisosomal hasta los lisosomas. En el caso de la toxina Shiga o de STxB, y por tanto las NPs funcionalizadas con dicha toxina, siguen una ruta no-canónica, al viajar vía retrógrada desde los endosomas al Golgi y RE, evitando los lisosomas.

A partir de estos resultados, se llevó a cabo un estudio más exhaustivo de la localización subcelular de los NMs. Para ello, se incubaron células Detroit 562 tanto con $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ como con $\text{AuNRs}@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ previamente funcionalizadas con la proteína STxB:6xHis, recogiendo muestras tras 30 min,

Resultados y discusión

2 h y 24 h de la incubación, que se fijaron y procesaron para ultra-microtomía e imagen TEM (Figura 46).

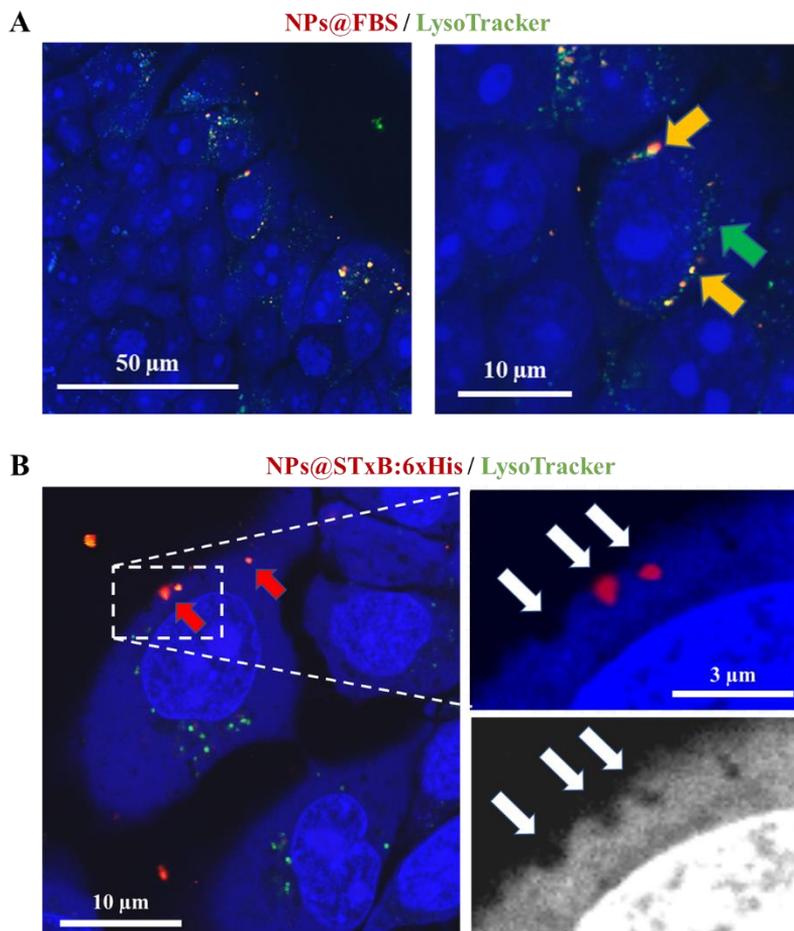


Figura 45. Localización intracelular y vesicular de las NPs funcionalizadas. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de células Detroit 562 incubadas con NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2RBITC$ funcionalizadas con proteínas séricas. La co-localización con lisosomas (teñidos con *LysoTracker*, canal verde) se indica con las flechas amarillas. (B) Las mismas NPs funcionalizadas con STxB:6xHis no co-localizan con lisosomas (flechas rojas). En la ampliación de la derecha, se muestran estas NPs interaccionando con la membrana celular formando estructuras tubulares (flechas blancas). Las estructuras celulares se tiñeron con naranja de acridina (canal azul).

Tras 30 min de incubación, se encuentran numerosas NPs interaccionando directamente con la membrana celular (Figura 46, pasos 1 y 2). Puede apreciarse cómo esta captación de NPs se ve favorecida gracias a extensiones de membrana de tipo filopodios (Figura 46, paso 1). Está descrito que, tras la unión de STxB al receptor Gb3, se produce una señalización intracelular que provoca la remodelación del citoesqueleto. En los márgenes de la membrana plasmática tiene lugar una concentración transitoria de actina y de otras proteínas que promueven la remodelación de la membrana para la formación de filopodios y lamelipodios (Takenouchi, 2004). Además, se conoce que en estas curvaturas de membrana y filopodios se acumulan las balsas lipídicas (Larive *et al.*, 2010), en las que se concentran entre otras moléculas los receptores Gb3. La toxina Shiga también es capaz de promover una curvatura e invaginación de la membrana en forma tubular para su entrada en la célula (Bassereau *et al.*, 2018; Römer *et al.*, 2007). En la Figura 46, paso 3, se puede distinguir una estructura de este tipo extendida desde la superficie de una célula expuesta a las NPs recubiertas con la toxina, captando las NPs de Fe₃O₄; también parece distinguirse una membrana en forma tubular similar rodeando a los AuNRs recubiertos con la toxina. Estos cambios morfológicos desencadenados por la presencia de la toxina sobre las NPs apoyarían la hipótesis de la interacción específica de la proteína STxB unida a la superficie de los NMs funcionalizados con el receptor Gb3, promoviendo la entrada de dichos NMs en la célula siguiendo una ruta de entrada alternativa a la endolisosomal mediada por receptores.

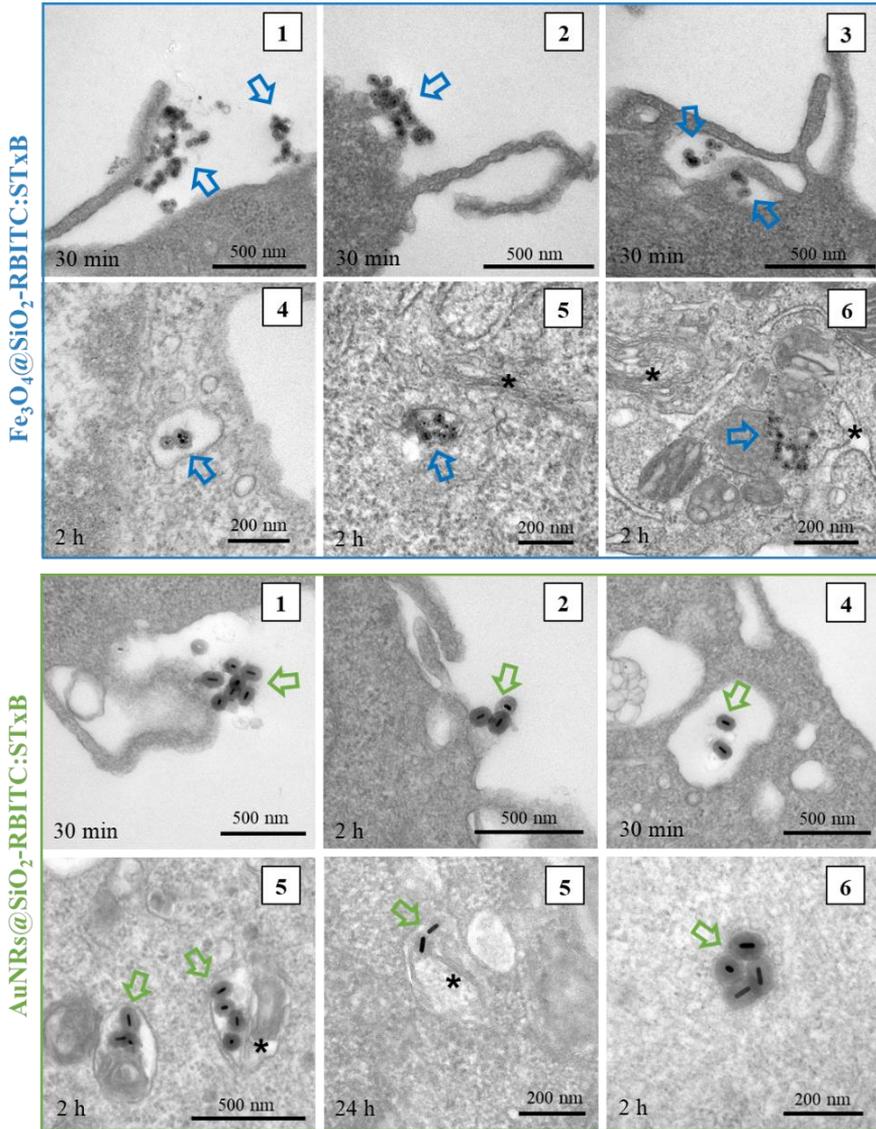


Figura 46. Mecanismo de entrada de los NMs funcionalizadas con STxB. Imágenes de TEM de secciones de células Detroit 562 expuestas a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}@SiO_2\text{-RBITC}$ (flechas azules) o $\text{AuNRs}@SiO_2\text{-RBITC}$ (flechas verdes), ambas funcionalizadas con STxB:6xHis. Ambos tipos de NM siguen la misma ruta; los números en cada imagen se corresponden con los diferentes pasos de la ruta retrógrada indicados en la Figura 44. En (1) los NMs interaccionan con los receptores en la superficie, presentes en muchos casos en las balsas lipídicas de filopodios, para posteriormente, ser aproximados a la superficie para su invaginación (2). La internalización se produce bien en estructuras tubulares que induce STxB (3) o en vesículas tipo endosomas (4). (5) A continuación, los NMs son transportados de endosomas tempranos y de reciclaje retrógradamente a Golgi y RE (marcados en asterisco). Finalmente, son capaces de escapar al citosol (6).

A tiempos cortos se aprecian también NPs en vesículas intracelulares, indicando que el proceso de interacción e internalización es rápido y eficiente. Se pueden encontrar NPs en lo que serían endosomas tempranos y de reciclaje (Figura 46, paso 4), las primeras vesículas de la ruta de entrada, para pasar a continuación a vesículas asociadas a la red del trans-Golgi y RE (Figura 46, paso 5). Esto indicaría que las células tienen además una elevada sensibilidad por STxB, ya que está descrito que aquellas células con sensibilidad moderada no transportan más allá del Golgi, mientras que, si la sensibilidad es mayor, pueden llegar a vesículas y orgánulos más distales en la ruta retrógrada (RE o incluso citosol). Este hecho parece estar influenciado por el tipo de isoformas de Gb3 que se encuentren en la célula y la longitud de su cadena de ácidos grasos (Clifford A. Lingwood, 2003). Diferentes estudios en los que se ha añadido STxB, bien conjugada a un fluoróforo o a fármacos, a células tumorales positivas para Gb3, muestran una clara co-localización de la subunidad con marcadores de Golgi en tiempos de exposición tan cortos como 15 min (Geyer *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2006; Maak *et al.*, 2011), consistente con el rápido transporte visto en el caso de los NMs y su localización en este tipo de orgánulos. Finalmente, también es posible encontrar NMs que están escapando o ya lo han hecho de estas vesículas para ser liberados al citosol (Figura 46, paso 6).

A la vista de todos estos resultados, se puede concluir que la proteína quimera STxB:6xHis es capaz de unirse a la superficie de diferentes NMs a través del dominio prediseñado de manera orientada, permitiendo la interacción específica de su sitio ligando con el receptor Gb3. Esta interacción desencadena una serie de mecanismos que activan la entrada de las NPs recubiertas con esta proteína quimera siguiendo la vía de transporte retrógrada, de igual manera que lo haría la toxina o la subunidad B en su forma libre, es decir, de forma biomimética. El hecho de haber obtenido los mismos resultados tanto con Fe₃O₄@SiO₂-RBITC como con AuNRs@SiO₂-RBITC, pone de

manifiesto que el mecanismo de entrada y transporte es independiente del material utilizado, de su forma o su tamaño, ya que va a ser la cubierta proteica con STxB:6xHis la que marca la identidad biológica del NM y la que, por tanto, va a determinar su interacción y destino en la célula. Además, este tipo de funcionalización supone una buena estrategia para dirigir selectivamente diferentes nanoterapias a células tumorales que sobreexpresen Gb3, como es el caso de CCC, evitando el ambiente ácido y degradativo de los lisosomas que podría dañar determinados nanomateriales y desactivar las terapias, perjudicando por tanto la aplicación final del diseño.

4. Terapia mediante hipertermia fotoinducida

La hipertermia es una modalidad de tratamiento contra el cáncer en el que el tumor es expuesto a altas temperaturas para destruir las células tumorales, o bien para hacerlas más susceptibles a otras modalidades de tratamiento. En el caso de la hipertermia fotoinducida, el calentamiento se produce irradiando la zona de interés con un láser cuya longitud de onda se encuentre en las conocidas como ventanas biológicas, de manera que pueda penetrar lo suficiente la piel y los tejidos. Por tanto, los NMs escogidos van a tener que absorber luz en estas franjas del espectro NIR para transformarla en calor. Como se ha visto en el Apartado 1.4. de los Resultados, donde se analizaban los espectros de absorción UV-vis-NIR, los materiales sintetizados en este trabajo, tanto los AuNRs como las NPs de Fe_3O_4 , cumplen estos requisitos.

En este apartado, se muestran resultados preliminares para el objetivo planteado de evaluar la hipertermia fotoinducida por estos NMs como potencial terapia en células tumorales de CCC.

4.1. Capacidad de calentamiento de los NMs sintetizados

En primer lugar, para comprobar la capacidad de calentamiento de dichos NMs, se hicieron estudios previos con los NMs en suspensión coloidal, los

cuales se irradiaron con un láser de 808 nm a una potencia de 750 mW. En la Figura 47 se muestran las curvas de calentamiento (arriba) y de enfriamiento (abajo) en función del tiempo, de una suspensión de NPs de Fe_3O_4 a una concentración de 7 mg/ml (Figura 47A) o bien de AuNRs a una concentración de Au de 0.3 mM (Figura 47B). Puede verse cómo, en menos de 10 min, la temperatura se incrementa hasta 10 °C de manera exponencial, para finalmente, aproximadamente tras 20 min de irradiación, establecerse un equilibrio en el que la temperatura deja de aumentar. En ambos tipos de NM, se consigue superar los 45 °C, llegando incluso a los 55 °C en el caso de la magnetita, temperaturas a partir de las cuales comienzan a producirse daños irreversibles en las células (Jaque *et al.*, 2014; Roti, 2008). No obstante, hay que tener en cuenta que en este ensayo se mide la temperatura de calentamiento del medio en el que se encuentran suspendidos los NMs; es decir, se obtiene una buena idea de la capacidad y eficiencia de calentamiento de los NMs y su potencial aplicabilidad en terapia, pero extrapolar a lo que ocurriría en las células o tejidos resulta complejo. En la Figura 47C se muestra un control en el que se irradió el mismo volumen de agua que en el caso de las suspensiones de NMs, con la misma potencia de láser. En este caso, hay una pequeña absorción de la luz por parte del agua, que se traduce en un ligero aumento de la temperatura, pero que no supera los 35 °C.

Tras apagar el láser, la suspensión coloidal comienza a enfriarse hasta recuperar la temperatura ambiente inicial, siguiendo un decaimiento exponencial, importante de cara a no prolongar efectos dañinos en las células y tejidos una vez cesa la irradiación.

Estas curvas de calentamiento y enfriamiento se han ajustado (curvas rojas en Figura 47) a un modelo basado en estudios previos (Jiang *et al.*, 2013; Roper *et al.*, 2007).

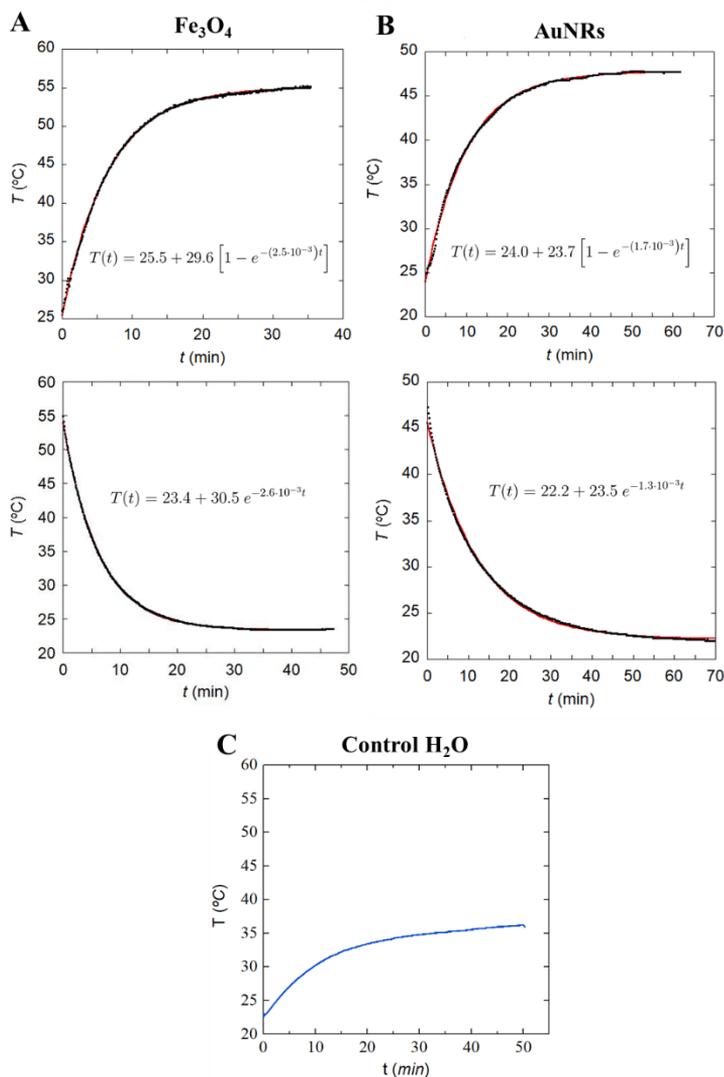


Figura 47. Calentamiento de las suspensiones de NMs. Curvas de calentamiento de suspensiones de Fe_3O_4 (7 mg/ml) (A) y de AuNRs ([Au]=0.3 mM) (B), con sus correspondientes curvas de enfriamiento (gráficas de abajo), en función del tiempo. (C) Control del calentamiento del agua tras ser irradiado a la misma potencia. En todos los casos, se irradió un volumen de 2 ml con un láser de 808 nm a una potencia de 750 mW.

El balance energético de una suspensión coloidal de NPs en una cubeta cuando se irradia con un láser, viene dado por la ecuación:

$$\sum_i m_i c_{P,i} \frac{dT}{dt} = \sum_j \frac{Q_j}{dt} \quad (1)$$

donde m_i y CP_i son la masa y el calor específico del sistema a presión constante (en este caso, las NPs, la cubeta y el termopar), respectivamente. T es la temperatura del sistema, y t es el tiempo. Q_j es un término que incluye Q_L , la energía del láser que las NPs transforman en calor; Q_w , el equivalente en agua de la cubeta; Q_c , las pérdidas de energía por conductividad térmica entre líquido-aire, líquido-cubeta y líquido-sensor de temperatura; y finalmente Q_s , que es la radiación emitida por las NPs por el hecho de estar a una temperatura distinta de cero.

El término Q_L , la disipación de calor por las NPs inducida por la irradiación con un láser a la longitud de onda de absorción, viene dado por:

$$Q_L = (P_0 - P_{tr})t\eta = P_0(1 - 10^{-A_\lambda})t\eta \quad (2)$$

Donde P_0 es la potencia de salida del láser, P_{tr} la potencia transmitida tras el paso del láser por la cubeta llena con la suspensión de NPs (con los espectros de absorción obtenidos, valores de absorbancia próximos a 2 indican que menos del 1% de la luz se está transmitiendo). η es un parámetro que representa la eficiencia de conversión de la potencia del láser en calor. A_λ es la absorbancia a la longitud de onda del láser. Q_L , el equivalente en agua de la cubeta, se evaluó midiendo el mismo volumen de líquido, pero sin NPs.

Una vez las NPs se calientan por la absorción de la radiación del láser, tienen lugar diferentes procesos, uno de ellos es el intercambio de calor por conducción, Q_c , entre las NPs y el líquido que las rodea por un gradiente de temperatura. Este proceso hace que la temperatura se homogenice en el líquido de suspensión. Así, el intercambio de calor entre la suspensión de NPs, el aire, la cubeta y el termopar puede integrarse en un solo término:

Resultados y discusión

$$Q_C = \sum hS(T - T_A) \quad (3)$$

Donde h es el coeficiente de transferencia de calor por convección, característico de cada material e interfase, y que va a depender de la forma y tamaño del NM. S es la superficie total de las NPs, T es la temperatura en función del tiempo y T_A la temperatura ambiente. Este término puede reemplazarse por una constante de enfriamiento $k = \frac{hS}{mc}$ a partir de la variación de temperatura de un sistema que no está a la misma temperatura que el entorno, m hace referencia a la masa y c al calor específico:

$$\frac{dT(t)}{dt} = -k[T(t) - T_A]^\beta \quad (4)$$

donde k es la constante de enfriamiento. Si $\beta = 1$, a esta ecuación se le conoce como ley de Newton del enfriamiento.

P_S representa el balance de la potencia emitida/absorbida por radiación térmica, es decir, la transferencia de energía emitida por las NPs, dada por:

$$P_S = \epsilon S \sigma (T^4 - T_A^4) \quad (5)$$

donde ϵ es la emisividad de superficie (valor entre 0 y 1), S la superficie total de las NPs y σ la constante de Stefan-Boltzmann. Si $(T - T_A) \ll T_A$, la ecuación 4 puede escribirse como:

$$P_S \simeq \epsilon S \sigma 4 T_A^3 (T - T_A) \quad (6)$$

Estos dos términos, P_S y Q_C , son los responsables de la pérdida de energía del sistema y, por tanto, del equilibrio que se alcanza a una temperatura máxima. Así, teniendo en cuenta todos estos términos (ecuaciones 2-4), la ecuación del balance de energía cuando una muestra de NPs se irradia con un láser puede expresarse como:

$$\sum_i m_i c_{P,i} \frac{dT}{dt} = (P_0 - P_{tr})\eta - \sum hS[T(t) - T_A] - \epsilon S\sigma 4T_A^3 [T(t) - T_A] \quad (7)$$

La solución de esta ecuación diferencial da la temperatura de la solución de NPs como una función del tiempo hasta que se alcanza el estado estacionario:

$$T(t) = T_A + \frac{(P_0 - P_{tr})\eta}{(m_l c_l + \epsilon S\sigma 4T_A^3)} \left[1 - e^{-\left(k + \frac{\epsilon S\sigma 4T_A^3}{m_l c_l}\right)t} \right] \quad (8)$$

Asumiendo que $T(t = 0) = T_A$ y que la masa y calor específico de las NPs es despreciable en comparación con los valores del agua (o ciclohexano) y, por tanto, en la ec. (1), $\sum_i m_i c_{P,i} \simeq m_l c_l$.

Una vez apagado el láser, el sistema se enfría hasta alcanzar un estado estacionario, siguiendo la ley de Newton del enfriamiento. Integrando la ec. (4) con $\beta = 1$, la temperatura de enfriamiento en función del tiempo sigue la ecuación:

$$T(t) = T_A + \frac{(P_0 - P_{tr})\eta}{m_l c_l k} \left[1 - e^{-kt} \right] \quad (9)$$

Como se aprecia en la Figura 47, las curvas de calentamiento y enfriamiento ajustan perfectamente con el modelo planteado. Es más, a partir del ajuste de los datos experimentales correspondientes a las curvas de enfriamiento de la Figura 47, es posible obtener la constante de enfriamiento k para ambas suspensiones coloidales, siendo $k = 2.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para las NPs de Fe_3O_4 , y $k = 1.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para los AuNRs. Este valor puede emplearse para reducir el número de variables de las curvas de calentamiento y conocida la superficie total de los AuNRs, S , la emisividad del oro en el NIR, ϵ , la masa de líquido, m_l , y su calor específico, c_l , estimar la eficiencia de la conversión de ambas suspensiones coloidales, η , de la radiación láser en calor para las concentraciones empleadas. Teniendo en cuenta todos estos parámetros, se han obtenido unas eficiencias de conversión de un 20% para los AuNRs y del 5% para el Fe_3O_4 . No obstante, cabe la posibilidad de que en el modelo planteado no se haya tenido en cuenta otras formas de pérdida de energía.

4.2. Efecto de la hipertermia fotoinducida con NMs en células

Tras comprobar la considerable capacidad de calentamiento de los NMs sintetizados en este trabajo, se realizaron una serie de pruebas preliminares en cultivos celulares de CCC para evaluar los daños producidos tras la irradiación con un láser NIR. Para ello, se añadieron a células Detroit 562 NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$, funcionalizadas con la proteína STxB:6xHis, a las concentraciones con las que previamente se había testado la viabilidad celular, 5 y 15 $\mu\text{g/ml}$ (ver Resultados, Apartado 1.7.). A dichas concentraciones, las NPs no provocan ningún tipo de alteración celular, por lo que cualquier efecto va a venir dado por la hipertermia fotoinducida tras la irradiación con láser. Tras 2 h de incubación con las NPs, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado para minimizar el calentamiento del medio por NPs en suspensión que pudiera enmascarar los resultados. Tras el lavado, se añadió al medio yoduro de propidio para teñir aquellas células cuya membrana esté dañada, indicativo de muerte celular por necrosis.

Se probaron diferentes tiempos de irradiación con el láser de 808 nm en función de la concentración de NPs. En la Figura 48 puede verse que, con la concentración más alta de 15 $\mu\text{g/ml}$, un solo minuto de irradiación basta para provocar la muerte de numerosas células en la zona irradiada. A menor dosis, de 5 $\mu\text{g/ml}$, con un tiempo de irradiación de 14 min, es posible obtener efectos similares. Estos resultados indican que va a ser posible ejercer un efecto terapéutico a demanda con dosis bajas de NPs.

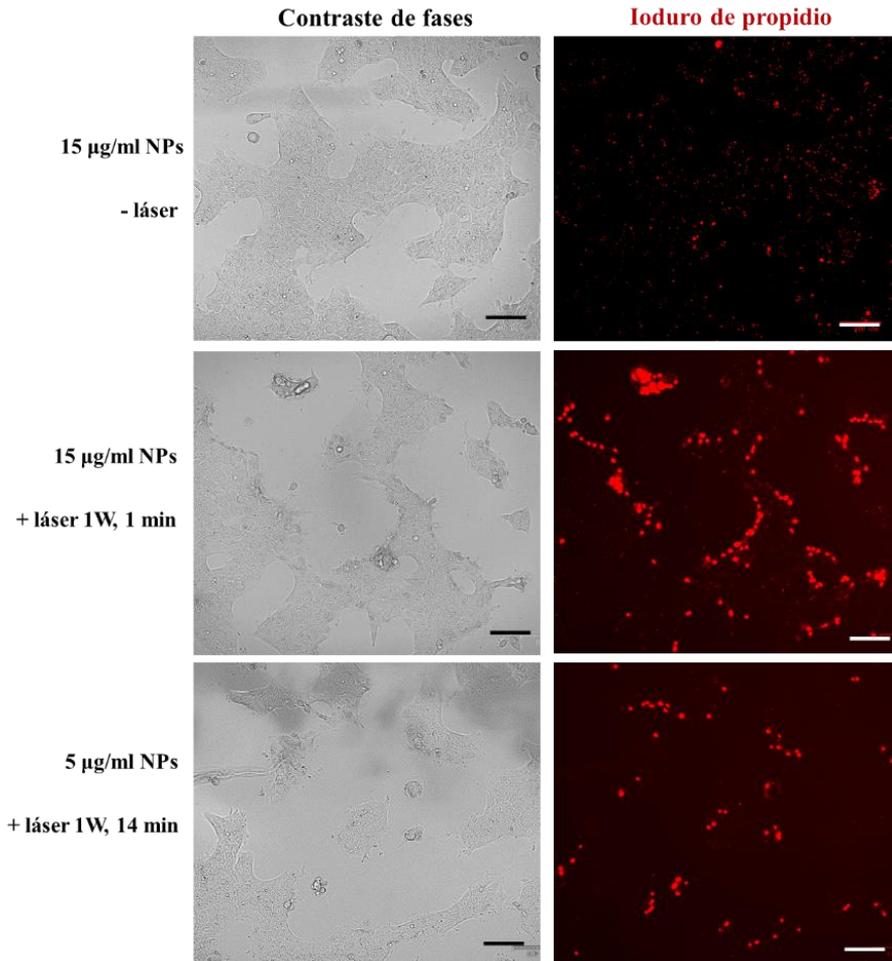


Figura 48. Efecto de la hipertermia fotoinducida con NPs en células Detroit 562. Imágenes de contraste de fases y fluorescencia de las células con NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RBITC}$ a diferentes concentraciones, antes y después de irradiarse con un láser de 808 nm a una potencia de 1W durante 1 o 14 min, en función de la concentración de NPs. Las imágenes se tomaron 1 h después de apagar el láser. Para visualizar la muerte celular, se añadió al medio de cultivo ioduro de propidio, que tiñe las células de rojo cuando su membrana está dañada. Barras de escala: 100 nm.

No obstante, como se ha mencionado, el método de tinción empleado está indicando que la muerte celular se está dando fundamentalmente por necrosis. Tras 2 h de incubación de las células con las NPs, muchas han entrado en las células, pero puede haber otras todavía en proceso de entrada o de interacción

con los receptores de membrana, por lo que su calentamiento podría estar dañando directamente la membrana citoplasmática produciendo la muerte celular por necrosis. Por ello, resultaría de interés realizar pruebas similares a diferentes tiempos de incubación hasta conseguir que las células desencadenen la muerte de forma programada, por apoptosis, dado que la necrosis no sería el tipo de muerte celular más adecuada para un tratamiento, pues está descrito que puede desencadenar procesos pro-inflamatorios que podrían provocar daños a células y tejido sano circundantes (Rock & Kono, 2008). Por ello, son necesarios estudios más exhaustivos para poder controlar tanto la dosis de NPs administradas, como la potencia del láser y el tiempo de exposición idóneos. En este sentido, como se explicará en el siguiente apartado y que da pie al último objetivo de la tesis, es de vital importancia poder determinar la temperatura de calentamiento, ya que ésta va a tener un efecto directo sobre los efectos provocados en las células y el tipo de muerte celular.

5. Determinación de la temperatura de calentamiento: nanotermómetros basados en $Y_2O_3:2\%Er^{3+}$

Uno de las claves para optimizar los tratamientos basados en hipertermia fotoinducida es conseguir determinar la temperatura de calentamiento para poder controlar los efectos provocados sobre las células y tejidos. Conseguir la combinación de calentamiento y monitorización de la temperatura en el mismo NM es un reto ambicioso, pero que facilitaría enormemente la aplicación de este tipo de tratamiento. Por ello, en este trabajo se ha optado por aportar un material que actúe como nanotermómetro óptico a modo de recubrimiento sobre las mismas NPs que se han trabajado a lo largo de la Tesis, al tener controladas sus propiedades. En este apartado se muestran algunos de los resultados preliminares que se han obtenido para este objetivo planteado.

De todos los lantánidos, el ion más empleado en termometría es el erbio (Er^{3+}), ya que sus dos multipletes $^4\text{S}_{3/2}$ y $^2\text{H}_{11/2}$ están separados por una diferencia de energía suficientemente pequeña como para que estén acoplados térmicamente, resultando en emisiones de luminiscencia en la región de 530 y de 550 nm, cuya intensidad es sensible a la temperatura, como ya se ha indicado.

Para obtener un método de determinación de la temperatura no invasivo, se suelen emplear nanotermómetros ópticos, en los que mediante un análisis espectral es posible determinar la temperatura con resolución espacial submicrométrica. Por sus propiedades, los iones de tierras raras son una opción muy destacada, siendo el Er^{3+} probablemente el más empleado al tener niveles de emisión termalizados y poco dependientes de la red cristalina, del entorno o las condiciones ambientales a las que se incorporan (Brites *et al.*, 2019; Jaque & Vetrone, 2012; Quintanilla & Liz-Marzán, 2018).

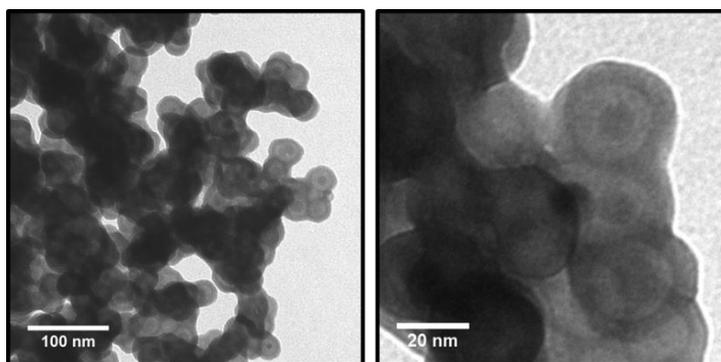


Figura 49. Imágenes de TEM de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ tras su recubrimiento con $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$. Puede apreciarse una capa más electrodensa sobre la sílice, de unos 7 nm de grosor.

En este trabajo, se ha empleado el óxido de ytrio (Y_2O_3) con impurezas de Er^{3+} como material para recubrir los NMs fotoactivables. Concretamente, como primera prueba, se han recubierto las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con una capa de Y_2O_3 dopada con un valor optimizado del 2% mol de Er^{3+} , a través de un

método de precipitación homogénea utilizando urea y los nitratos de ytrio y erbio, seguido de un tratamiento térmico a 700 °C (F. Zhang *et al.*, 2010). En la Figura 49 se muestran imágenes de TEM de las NPs tras el recubrimiento, en las que se puede apreciar la formación de una capa más electrodensa de ~7 nm correspondiente al $Y_2O_3:Er^{3+}$ alrededor la capa de SiO_2 que recubre la magnetita.

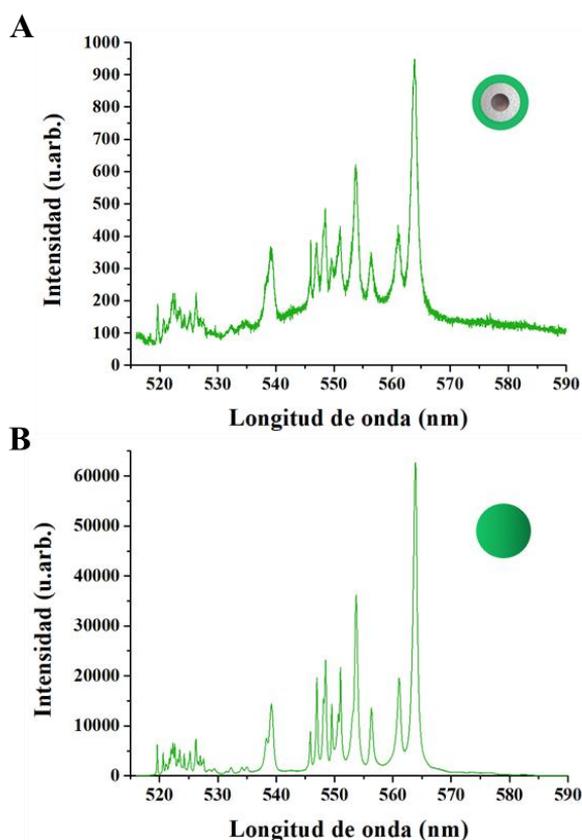


Figura 50. Espectros de emisión del $Y_2O_3:2\%Er^{3+}$. La posición de los picos de emisión de las NPs $Fe_3O_4@SiO_2@Y_2O_3:2\%Er^{3+}$ (A) coinciden con los de las NPs compuestas únicamente por $Y_2O_3:2\%Er^{3+}$ (B), confirmando la formación de la misma estructura cristalina.

En la Figura 50A se muestran los espectros de emisión de estas NPs recubiertas de la Figura 49 tras su excitación con la línea de 514.5 nm del láser de $Ar^{+}-Kr^{+}$, revelando una serie de picos en las regiones entre ~520-540 nm y entre

~545-570 nm, correspondientes a las transiciones entre los niveles ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$, y ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ del erbio, respectivamente. La posición a la que aparecen todos estos picos coincide perfectamente con los de la muestra de referencia de $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$ (Figura 50B), confirmando que se ha formado el material con la misma estructura cristalina. Se aprecia una señal más ruidosa en el caso del recubrimiento, atribuible a la menor cantidad de material en comparación a NPs formadas únicamente por $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$.

El estudio de la intensidad de estas emisiones, al venir de niveles termalizados, va a permitir relacionar, mediante una recta de calibrado, la relación de intensidades de ambas transiciones con la temperatura, pudiendo emplearse como nanotermómetros. La principal ventaja de este tipo de termometría es que la técnica ratiométrica es *per se* un método con referencia interna, proporcionando medidas absolutas de la temperatura. Además, la relación de intensidades no depende de la longitud de onda de excitación ni de la concentración de NPs, minimizando las fuentes de error a la hora de la determinación de la temperatura.

La calibración se realizó recogiendo la emisión de una muestra en polvo de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$ sintetizadas, en función de la temperatura tras calentarse con una platina calefactora. Para asegurar la precisión de la calibración, se utilizó una potencia del láser de excitación lo más baja posible, para descartar un potencial calentamiento por el láser en el entorno de la muestra. La Figura 51A muestra la emisión de las NPs (dada por el Er^{3+}) en función de la temperatura en el rango entre 22 y 70 °C (295-343 K). Como puede observarse, las intensidades de las transiciones centradas en aproximadamente 530 y 550 nm (correspondientes con I_2 e I_1 , respectivamente) tienen comportamientos contrarios, a medida que se incrementa la temperatura: la emisión desde el multiplete ${}^2\text{H}_{11/2}$ a 530 nm aumenta, al aumentar la población del nivel de mayor energía a expensas del nivel de menor energía (${}^4\text{S}_{3/2}$), cuya intensidad disminuye con la temperatura.

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta la relación de intensidades de emisión entre estos estados termalizados y la temperatura, de acuerdo a la ecuación:

$$FIR = \frac{I_2}{I_1} = C \exp\left(\frac{-\Delta E}{k_B T}\right) \rightarrow \ln(FIR) = \ln \frac{I_2}{I_1} = \ln C - \frac{\Delta E}{k_B T}$$

la dependencia de la emisión en función de la temperatura se puede obtener fácilmente ajustando los valores experimentales de $\ln(FIR)$ frente a $1/T$ a una recta cuya pendiente está relacionada con la diferencia de energía ΔE entre ambos multipletes (Figura 51A, derecha). Puede apreciarse una dependencia lineal clara, confirmando así la excelente capacidad del material de recubrimiento como sensor de temperatura. Con este ajuste lineal, a partir de la pendiente ($\Delta E/k_B$), se obtiene un valor de la diferencia de energía entre los dos niveles de emisión de $\Delta E = 767 \text{ cm}^{-1}$. Este valor es próximo al que se estima experimentalmente a partir de los espectros de emisión, de $\Delta E = 791 \text{ cm}^{-1}$, a partir de las posiciones de 539 nm para la emisión del nivel $^2H_{11/2}$, y 564 nm para el $^4S_{3/2}$. También es consistente con los valores obtenidos tanto en la muestra referencia de $Y_2O_3:2\%Er^{3+}$ (769.8 cm^{-1}) (Figura 51B), como con valores previamente reportados para otros materiales dopados con Er^{3+} (Debasu *et al.*, 2013; Quintanilla *et al.*, 2011; Vetrone *et al.*, 2010; X. Yang *et al.*, 2015).

Un parámetro importante en nanotermometría es el valor de sensibilidad absoluta del NM, que se define como el grado de cambio del FIR en respuesta a la variación de temperatura:

$$S = \left| \frac{dFIR}{dT} \right| = FIR \frac{\Delta E}{k_B T^2}$$

Al haber trabajado en este estudio en un rango limitado de temperaturas relativamente bajas por su interés biológico, la representación de S en función de T no arrojaría datos relevantes, puesto que otros trabajos indican que este mismo material, Y_2O_3 , con el mismo % mol de impurezas de Er^{3+} , presenta una

sensibilidad máxima en ~ 600 K, con $S = 3.5 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (valores fuera del rango de temperaturas aquí empleado) (Gutiérrez Cano, 2019).

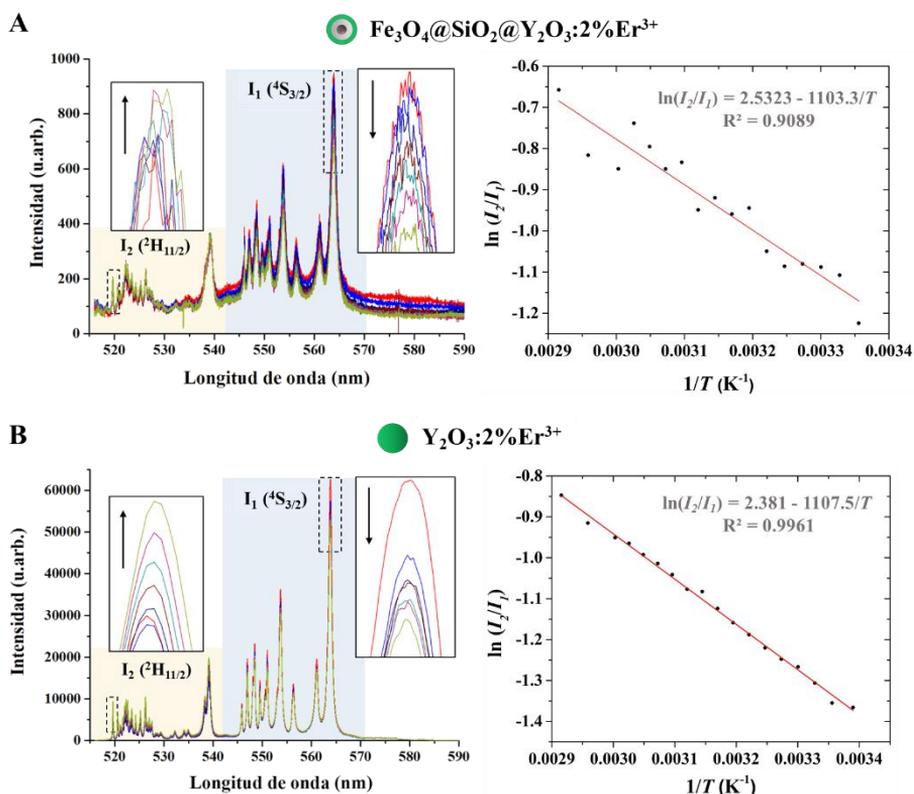


Figura 51. Calibrado de la relación de intensidades de emisión en función de la temperatura. (A) Espectros de emisión de las NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$ en función de la temperatura. El multiplete marcado en amarillo, correspondiente con la emisión del nivel $^2\text{H}_{11/2}$ (I_2), aumenta a expensas del nivel de menor energía, $^4\text{S}_{3/2}$ (azul, I_1), cuya intensidad disminuye con la temperatura. A la derecha se muestra la recta de calibrado resultado de representar $\ln(I_2/I_1)$ en función de $1/T$. (B) Emisión de las NPs de $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$ de referencia, con la correspondiente recta de ajuste. En ambos casos, se obtiene la misma tendencia con el calentamiento, con un ajuste lineal de pendiente muy similar. La excitación se realizó con un láser de 514.5 nm.

Una vez obtenida la relación entre intensidades de emisión y la temperatura, es posible realizar el experimento opuesto; es decir, determinar la temperatura

Resultados y discusión

a partir de los espectros de emisión de las NPs. El último paso en esta serie de experimentos sería poder determinar la temperatura en el interior de las células una vez los NMs han sido internalizados y se ha aplicado la radiación de un láser NIR a tiempo real, con el fin de poder controlar el efecto inducido sobre las mismas, y así poder optimizar el tratamiento.

CONCLUSIONES

1. Los nanomateriales sintetizados presentan los requisitos buscados de multifuncionalidad, al presentar un núcleo fotoactivable y una cubierta de sílice fluorescente que permite tanto la detección del nanomaterial en células y tejidos, como su posterior conjugación con moléculas ligando de direccionamiento.
2. Se ha conseguido diseñar y producir una proteína ligando de direccionamiento conformada por la secuencia de la subunidad B de la toxina Shiga fusionada a una secuencia aminoacídica policatiónica de 6 histidinas, que sirve para su conjugación estable y orientada en la superficie de los nanomateriales con carga superficial negativa.
3. Los nanomateriales biofuncionalizados con la proteína recombinante STxB:6xHis son capaces de interactuar específicamente con el receptor Gb3 en células de cáncer de cabeza y cuello, y entrar en estas células siguiendo, de forma biomimética, la vía retrógrada que sigue la toxina libre. Esta ruta no canónica evita las vesículas endo-lisomales.
4. Los nanomateriales desarrollados tienen la capacidad de ejercer un efecto terapéutico activable únicamente a demanda mediante hipertermia fotoinducida tras la aplicación de un láser NIR de 808 nm.
5. Se ha conseguido recubrir NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con una capa de $\text{Y}_2\text{O}_3:2\%\text{Er}^{3+}$ capaz de modificar la intensidad de sus bandas de emisión en función de la temperatura, pudiendo realizarse la correspondiente recta de calibración. A partir de este calibrado, se puede determinar *in situ* y de forma no invasiva la temperatura que alcanzan las NPs en el interior de las células tras la irradiación con un láser NIR.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde-Cela, S., Aldeanueva-Potel, P., Mateo-Mateo, C., Rodríguez-Lorenzo, L., Alvarez-Puebla, R. A., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. *Journal of the Royal Society Interface*, 7.
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7), 2313–2333.
- Alkilany, A. M., Nagaria, P. K., Hexel, C. R., Shaw, T. J., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2009). Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small*, 5(6), 701–708.
- Alkilany, A. M., Shatanawi, A., Kurtz, T., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2012). Toxicity and cellular uptake of gold nanorods in vascular endothelium and smooth muscles of isolated rat blood vessel: Importance of surface modification. *Small*, 8(8), 1270–1278.
- Alvarez-Puebla, R. A., & Liz-Marzán, L. M. (2010). SERS-based diagnosis and biodetection. *Small*, 6(5), 604–610.
- Amessou, M., Carrez, D., Patin, D., Sarr, M., Grierson, D. S., Croisy, A., ... Johannes, L. (2008). Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-β-GluOH)₃ selectively potentiates its photodynamic activity. *Bioconjugate Chemistry*, 19(2), 532–538.
- Arab, S., Russel, E., Chapman, W. B., Rosen, B., & Lingwood, C. A. (1997). Expression of the verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramide, in ovarian hyperplasias. *Oncology Research*, 9(10), 553–563.
- Arab, S., Rutka, J., & Lingwood, C. (1999). Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncology Research*, 11(1), 33–39.
- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., & Krishnan, K. M. (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8576–8607.
- Baddour, H. M., Magliocca, K. R., & Chen, A. Y. (2016). The importance of margins in head and neck cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 113(3), 248–255.
- Bae, S. W., Tan, W., & Hong, J.-I. (2012). Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications. *Chemical Communications*, 48(17), 2270.
- Bañobre-López, M., Teijeiro, A., & Rivas, J. (2013). Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 18(6), 397–400.
- Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V. A., ... Weikl, T. R. (2018). The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 51.
- Basu, D., Li, X., Kahn, J. N., May, K. L., Kahn, P. C., & Tumer, E. (2016). *The AI*

Bibliografía

- Subunit of Shiga Toxin 2 Has Higher Affinity for Ribosomes and Higher Catalytic Activity than the A1 Subunit of Shiga Toxin 1.* 84(1), 149–161.
- Beddoe, T., Paton, A. W., Le Nours, J., Rossjohn, J., & Paton, J. C. (2010). Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 411–418.
- Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., & Kamrava, S. K. (2016). Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*, 235, 205–221.
- Bernier, J., Bentzen, S. M., & Vermorken, J. B. (2009). Molecular therapy in head and neck oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(5), 266–277.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25.
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43(3), 744–764.
- Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373–2387.
- Bolot, G., David, M. J., Taki, T., Handa, S., Kasama, T., Richard, M., ... Portoukalian, J. (1998). Analysis of glycosphingolipids of human head and neck carcinomas with comparison to normal tissue. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 46(1), 125–135.
- Bose, P., Brockton, N. T., & Dort, J. C. (2013). Head and neck cancer: From anatomy to biology. *International Journal of Cancer*, 133(9), 2013–2023.
- Brand, T. M., Iida, M., & Wheeler, D. L. (2011). Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biology and Therapy*, 11(9), 777–792.
- Braun, K., Pochert, A., Beck, M., Fiedler, R., Gruber, J., & Lindén, M. (2016). Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 79(2), 319–327.
- Brites, C. D. S., Balabhadra, S., & Carlos, L. D. (2019). Lanthanide-Based Thermometers: At the Cutting-Edge of Luminescence Thermometry. *Advanced Optical Materials*, 7(5), 1801239.
- Brites, C. D. S., Lima, P. P., Silva, N. J. O., Millán, A., Amaral, V. S., Palacio, F., & Carlos, L. D. (2011). Lanthanide-based luminescent molecular thermometers. *New Journal of Chemistry*, 35(6), 1177–1183.
- Brites, C. D. S., Lima, P. P., Silva, N. J. O., Millán, A., Amaral, V. S., Palacio, F., & Carlos, L. D. (2012). Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale*, 4(16), 4799–

4829.

- Chen, H., Burnett, J., Zhang, F., Zhang, J., Paholak, H., & Sun, D. (2014). Highly crystallized iron oxide nanoparticles as effective and biodegradable mediators for photothermal cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(7), 757–765.
- Chu, M., Shao, Y., Peng, J., Dai, X., Li, H., Wu, Q., & Shi, D. (2013). Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 34(16), 4078–4088.
- Clavel, C. M., Nowak-Sliwinska, P., Păunescu, E., & Dyson, P. J. (2015). Thermoresponsive fluorinated small-molecule drugs: A new concept for efficient localized chemotherapy. *MedChemComm*, 6(12), 2054–2062.
- Cole, L. E., Ross, R. D., Tilley, J. M., Vargo-Gogola, T., & Roeder, R. K. (2015). Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine (London, England)*, 10(2), 321–341.
- Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M. F., Gutiérrez, L., Morales, M. P., Böhm, I. B., ... Parak, W. J. (2012). Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 41(11), 4306–4334.
- Cooling, L. L. W., Zhang, D. S., Naides, S. J., & Koerner, T. A. W. (2003). Glycosphingolipid expression in acute nonlymphocytic leukemia: Common expression of shiga toxin and parvovirus B19 receptors on early myeloblasts. *Blood*, 101(2), 711–721.
- Croissant, J. G., Fatieiev, Y., & Khashab, N. M. (2017). Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials*, 29(9).
- Deatsch, A. E., & Evans, B. A. (2014). Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 354, 163–172.
- Debasu, M. L., Ananias, D., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M., Rocha, J., & Carlos, L. D. (2013). All-In-One Optical Heater-Thermometer Nanoplatfrom Operative From 300 to 2000 K Based on Er³⁺ Emission and Blackbody Radiation. *Advanced Materials*, 25(35), 4868–4874.
- Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I., & Minchin, R. F. (2011). Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology*, 6(1), 39–44.
- Devenica, D., Čikeš Čulić, V., Vuica, A., & Markotić, A. (2011). Biochemical, pathological and oncological relevance of Gb3Cer receptor. *Medical Oncology*, 28(1).
- Dieke, G. H., & Crosswhite, H. (1968). *Spectra and energy levels of rare earth ions in crystals*. Interscience Publishers.
- Distler, U., Souady, J., Hülsewig, M., Drmić-Hofman, I., Haier, J., Friedrich, A. W., ... Müthing, J. (2009). Shiga Toxin Receptor Gb3Cer/CD77: Tumor-

Bibliografía

- Association and Promising Therapeutic Target in Pancreas and Colon Cancer. *PLoS ONE*, 4(8), e6813.
- Dolez, P. I. (2015). Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications. In *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2006). Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters*, 239(1), 129–135.
- Espinosa, A., Di Corato, R., Kolosnjaj-Tabi, J., Flaud, P., Pellegrino, T., & Wilhelm, C. (2016). Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano*, 10(2), 2436–2446.
- Estelrich, J., Sánchez-Martín, M. J., & Busquets, M. A. (2015). Nanoparticles in magnetic resonance imaging: From simple to dual contrast agents. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1727–1741.
- Falguieres, T., Maak, M., von Weyhern, C., Sarr, M., Sastre, X., Poupon, M.-F., ... Janssen, K.-P. (2008). Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2498–2508.
- Farkas-Himsley, H., Hill, R., Rosen, B., Arab, S., & Lingwood, C. A. (1995). The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6996–7000.
- Feng, Q., Liu, Y., Huang, J., Chen, K., Huang, J., & Xiao, K. (2018). Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
- Fernández-López, C., Mateo-Mateo, C., Álvarez-Puebla, R. A., Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., & Liz-Marzán, L. M. (2009). Highly controlled silica coating of PEG-capped metal nanoparticles and preparation of SERS-encoded particles. *Langmuir*, 25(24), 13894–13899.
- Fielding, A. B., Willox, A. K., Okeke, E., & Royle, S. J. (2012). Clathrin-mediated endocytosis is inhibited during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6572–6577.
- Filho, M. F. M., Walder, F., Takahashi, H. K., Guimarães, L. L., Tanaka, A. K., Cervantes, O., & Straus, A. H. (2015). Glycosphingolipid expression in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72(1), 25–30.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186.
- Gans, R. (1912). Über die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. *Annalen Der Physik*, 342(5), 881–900.

- Geitenbeek, R. G., Salzmann, B. B. V., Nieuwelink, A. E., Meijerink, A., & Weckhuysen, B. M. (2019). Chemically and thermally stable lanthanide-doped Y_2O_3 nanoparticles for remote temperature sensing in catalytic environments. *Chemical Engineering Science*, *198*, 235–240.
- Geyer, P. E., Maak, M., Nitsche, U., Perl, M., Novotny, A., Slotta-Huspenina, J., ... Janssen, K.-P. (2016). Gastric Adenocarcinomas Express the Glycosphingolipid Gb(3)/CD77: Targeting of Gastric Cancer Cells with Shiga Toxin B-Subunit. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(5), 1008–1017.
- Goel, S., Chen, F., Hong, H., Valdovinos, H. F., Hernandez, R., Shi, S., ... Cai, W. (2014). VEGF₁₂₁-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticle: A Tumor Targeted Drug Delivery System. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *6*(23), 21677–21685.
- Gómez-Salces, S., Aguado, F., Rodríguez, F., Valiente, R., González, J., Haumont, R., & Kreisel, J. (2012). Effect of pressure on the band gap and the local FeO_6 environment in $BiFeO_3$. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, *85*(14).
- González-Domínguez, E., Iturrioz-Rodríguez, N., Padín-González, E., Villegas, J. C., García-Hevia, L., Pérez-Lorenzo, M., ... Fanarraga, M. L. (2017). Carbon nanotubes gathered onto silica particles lose their biomimetic properties with the cytoskeleton becoming biocompatible. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 6317–6328.
- González-Fernández, M. A., Torres, T. E., Andrés-Vergés, M., Costo, R., de la Presa, P., Serna, C. J., ... Goya, G. F. (2009). Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *Journal of Solid State Chemistry*, *182*(10), 2779–2784.
- Goya, G. F., Berquó, T. S., Fonseca, F. C., & Morales, M. P. (2003). Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, *94*(5), 3520–3528.
- Grenier, P., Viana, I. M. de O., Lima, E. M., & Bertrand, N. (2018). Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. *Journal of Controlled Release*, *287*, 121–131.
- Guerrero-Martínez, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Advanced Materials*, *22*(11), 1182–1195.
- Gutiérrez Cano, V. (2019). *Caracterización físico-química y espectroscópica de recubrimientos cerámicos avanzados y nanotermómetros*.
- Gutiérrez, L., Costo, R., Grüttner, C., Westphal, F., Gehrke, N., Heinke, D., ... Morales, M. P. Synthesis methods to prepare single- and multi-core iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Dalton Transactions*, *44*, 2943–2952.
- H. Müller, K., Kulkarni, J., Motskin, M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J. N., ...

Bibliografía

- Porter, A. E. (2010). pH-Dependent Toxicity of High Aspect Ratio ZnO Nanowires in Macrophages Due to Intracellular Dissolution. *ACS Nano*, 4(11), 6767–6779.
- Hao, N., Liu, H., Li, L., Chen, D., Li, L., & Tang, F. (2012). In Vitro Degradation Behavior of Silica Nanoparticles Under Physiological Conditions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(8), 6346–6354.
- He, Q., Shi, J., Zhu, M., Chen, Y., & Chen, F. (2010). The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous and Mesoporous Materials*, 131(1–3), 314–320.
- He, Y. P., Miao, Y. M., Li, C. R., Wang, S. Q., Cao, L., Xie, S. S., ... Burda, C. (2005). Size and structure effect on optical transitions of iron oxide nanocrystals. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 71(12).
- Heath-Engel, H. M., & Lingwood, C. A. (2003). Verotoxin sensitivity of ECV304 cells in vitro and in vivo in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis*, 6(2), 129–141.
- Hendel, T., Wuithschick, M., Kettemann, F., Birnbaum, A., Rademann, K., & Polte, J. (2014). In situ determination of colloidal gold concentrations with uv-vis spectroscopy: Limitations and perspectives. *Analytical Chemistry*, 86(22), 11115–11124.
- Herda, L. M., Hristov, D. R., Lo Giudice, M. C., Polo, E., & Dawson, K. A. (2017). Mapping of Molecular Structure of the Nanoscale Surface in Bionanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 139(1), 111–114.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., ... Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 43(1), 33–56.
- Hillen, F., & Griffioen, A. W. (2007). *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*.
- Hoey, D. E. E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C. A., Gally, D. L., & Smith, D. G. E. (2003). Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cellular Microbiology*, 5(2), 85–97.
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28.
- Huang, X., Neretina, S., & El-Sayed, M. A. (2009). Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*, 21(48), 4880–4910.
- Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1382(2), 191–206.

- Iturrioz-Rodríguez, N., Corea-Duarte, M. A., Valiente, R., & Fanarraga, M. L. (n.d.). The cytosolic degradation of mesoporous silica particles is independent of biomolecules. *In Preparation*.
- Iturrioz-Rodríguez, N., González-Domínguez, E., González-Lavado, E., Marín-Caba, L., Vaz, B., Pérez-Lorenzo, M., ... Fanarraga, M. L. (2017). A Biomimetic Escape Strategy for Cytoplasm Invasion by Synthetic Particles. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(44), 13736–13740.
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(14), 7238–7248.
- Janssen, K. P., Vignjevic, D., Boisgard, R., Falguières, T., Bousquet, G., Decaudin, D., ... Johannes, L. (2006). In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Research*, 66(14), 7230–7236.
- Jaque, D., Martínez Maestro, L., Del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., ... García Solé, J. (2014). Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*, 6(16), 9494–9530.
- Jaque, D., & Vetrone, F. (2012). Luminescence nanothermometry. *Nanoscale*, 4(15), 4301–4326.
- Jiang, K., Smith, D. A., & Pinchuk, A. (2013). Size-dependent photothermal conversion efficiencies of plasmonically heated gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(51), 27073–27080.
- Johannes, L., & Popoff, V. (2008). Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking. *Cell*, 135(7), 1175–1187.
- Johannes, L., & Römer, W. (2010). Shiga toxins from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(2), 105–116.
- Johansson, D., Johansson, A., Grankvist, K., Andersson, U., Henriksson, R., Bergström, P., ... Behnam-Motlagh, P. (2006). Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biology and Therapy*, 5(9), 1211–1217.
- Johansson, D., Kosovac, E., Moharar, J., Ljuslinder, I., Brännström, T., Johansson, A., & Behnam-Motlagh, P. (2009). Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis. *BMC Cancer*, 9, 1–9.
- Kandasamy, G., & Maity, D. (2015). Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 191–218.
- Kelly, P. M., Åberg, C., Polo, E., O'Connell, A., Cookman, J., Fallon, J., ... Dawson, K. A. (2015). Mapping protein binding sites on the biomolecular corona of nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 10(5), 472–479.

Bibliografía

- Kolen'ko, Y. V., Bañobre-López, M., Rodríguez-Abreu, C., Carbó-Argibay, E., Sailsman, A., Piñeiro-Redondo, Y., ... Rivas, J. (2014). Large-Scale Synthesis of Colloidal Fe₃O₄ Nanoparticles Exhibiting High Heating Efficiency in Magnetic Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(16), 8691–8701.
- Kovbasnjuk, O., Mourtazina, R., Baibakov, B., Wang, T., Elowsky, C., Choti, M. A., ... Donowitz, M. (2005). The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1(14), 1–6.
- LaCasse, E. C., Bray, M. R., Patterson, B., Lim, W.-M., Perampalam, S., Radvanyi, L. G., ... Gariépy, J. (1999). Shiga-Like Toxin-1 Receptor on Human Breast Cancer, Lymphoma, and Myeloma and Absence From CD34+ Hematopoietic Stem Cells: Implications for Ex Vivo Tumor Purging and Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood*, 94(8), 2901–2910.
- Larive, R. M., Baisamy, L., Urbach, S., Coopman, P., & Bettache, N. (2010). Cell membrane extensions, generated by mechanical constraint, are associated with a sustained lipid raft patching and an increased cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(3), 389–400.
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 269–282.
- Lencer, W. I., & Saslowsky, D. (2005). Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1746(3), 314–321.
- Lepock, J. R., Frey, H. E., Rodahl, A. M., & Kruuv, J. (1988). Thermal analysis of CHL V79 cells using differential scanning calorimetry: Implications for hyperthermic cell killing and the heat shock response. *Journal of Cellular Physiology*, 137(1), 14–24.
- Leuenberger, P., Gansch, S., Kahraman, A., Cappelletti, V., Boersema, P. J., Von Mering, C., ... Picotti, P. (2017). Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science*, 355(6327), eaai7825.
- Lingwood, C. A., Binnington, B., Manis, A., & Branch, D. R. (2010). Globotriaosyl ceramide receptor function - Where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Letters*, 584(9), 1879–1886.
- Lingwood, Clifford A. (2003). Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. *Methods in Molecular Medicine*, 73, 165–186.
- Liu, Y., Xia, Q., Liu, Y., Zhang, S., Cheng, F., Zhong, Z., ... Xiao, K. (2014). Genotoxicity assessment of magnetic iron oxide nanoparticles with different particle sizes and surface coatings. *Nanotechnology*, 25(42).
- Liz-Marzán, L. M. (2006). Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*, 22(1), 32–41.

- Luginbuehl, V., Meier, N., Kovar, K., & Rohrer, J. (2018). Intracellular drug delivery: Potential usefulness of engineered Shiga toxin subunit B for targeted cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 36(3), 613–623.
- Maak, M., Nitsche, U., Keller, L., Wolf, P., Sarr, M., Thiebaud, M., ... Janssen, K.-P. (2011). Tumor-Specific Targeting of Pancreatic Cancer with Shiga Toxin B-Subunit. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(10), 1918–1928.
- Maeda, H., Nakamura, H., & Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 71–79.
- Mahmoudi, M. (2018). Antibody orientation determines corona mistargeting capability. *Nature Nanotechnology*, (i), 1–2.
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(3), 386–396.
- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum*, 2(4), 1–21.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen Der Physik*, 330(3), 377–445.
- Moghim, S. M., Andersen, A. J., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L., & Hunter, A. C. (2011). Material properties in complement activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(12), 1000–1007.
- Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), 779–786.
- Monopoli, M. P., Pitek, A. S., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2013). Nanomaterial Interfaces in Biology. *Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1025, 137–155.
- Morup, S., Bodker, F., Hendriksen, P. V., & Linderoth, S. (1995). Spin-glass-like ordering of the magnetic moments of interacting nanosized maghemite particles. *Physical Review B*, 52(1), 287–294.
- Mudunkotuwa, I. A., & Grassian, V. H. (2014). Histidine adsorption on TiO₂ nanoparticles: An integrated spectroscopic, thermodynamic, and molecular-based approach toward understanding nano-bio interactions. *Langmuir*, 30(29), 8751–8760.
- Nakamura, Y., Mochida, A., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2016). Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), 2225–2238.
- Nallathamby, P. D., Hopf, J., Irimata, L. E., McGinnity, T. L., & Roeder, R. K. (2016). Preparation of fluorescent Au–SiO₂ core–shell nanoparticles and nanorods with

Bibliografía

- tunable silica shell thickness and surface modification for immunotargeting. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(32), 5418–5428.
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M. Z., Ahmed, F. J., Maitra, A. N., Prashant, C. K., & Dinda, A. K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 983–989.
- Navarro-Palomares, E., González-Saiz, P., Renero-Lecuna, C., Martín-Rodríguez, R., Aguado, F., González-Alonso, D., ... Valiente, R. (n.d.). Biodegradable dye-doped silica fluorescent coating: multifunctional nanoparticles for cell assays and toxicity reduction. *Nanoscale, en revisió*.
- Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 49–70.
- Pelaz, B., del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., ... Parak, W. J. (2015). Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano*, 9(7), 6996–7008.
- Peng, M., Li, H., Luo, Z., Kong, J., Wan, Y., Zheng, L., ... Cui, Y. (2015). Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo. *Nanoscale*, 7(25), 11155–11162.
- Pezeshkian, W., Hansen, A. G., Johannes, L., Khandelia, H., Shillcock, J. C., Kumar, P. B. S., & Ipsen, J. H. (2016). Membrane invagination induced by Shiga toxin B-subunit: from molecular structure to tube formation. *Soft Matter*, 12(23), 5164–5171.
- Quintanilla, M., Cantelar, E., Cussó, F., Villegas, M., & Caballero, A. C. (2011). Temperature sensing with up-converting submicron-sized $\text{LiNbO}_3:\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ particles. *Applied Physics Express*, 4(2).
- Quintanilla, M., & Liz-Marzán, L. M. (2018). Guiding Rules for Selecting a Nanothermometer. *Nano Today*, 19, 126–145.
- Rana, S., Yeh, Y. C., & Rotello, V. M. (2010). Engineering the nanoparticle-protein interface: Applications and possibilities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 828–834.
- Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2012). Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.*, 112(11), 5818–5878.
- Rivas, J., Bañobre-López, M., Piñeiro-Redondo, Y., Rivas, B., & López-Quintela, M. A. (2012). Magnetic nanoparticles for application in cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(21), 3499–3502.
- Rock, K. L., & Kono, H. (2008). The Inflammatory Response to Cell Death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 99–126.

- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., ... Johannes, L. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, *450*(7170), 670–675.
- Roper, D. K., Ahn, W., & Hoepfner, M. (2007). Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, *111*(9), 3636–3641.
- Roti, J. L. R. (2008). Cellular responses to hyperthermia (40-46°C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, *24*(1), 3–15.
- Ruiz, A., Salas, G., Calero, M., Hernández, Y., Villanueva, A., Herranz, F., ... Morales, M. P. (2013). Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta Biomaterialia*, *9*(5), 6421–6430.
- Salhia, B., Rutka, J. T., Lingwood, C., Nutikka, A., & Van Furth, W. R. (2002). The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia*, *4*(4), 304–311.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A. B., Skotland, T., & Torgersen, M. L. (2010). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*, *56*(7), 1181–1185.
- Saptarshi, S. R., Duschl, A., & Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, *11*(1), 1–12.
- Satzer, P., Svec, F., Sekot, G., & Jungbauer, A. (2016). Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Engineering in Life Sciences*, *16*(3), 238–246.
- Scarabelli, L., Grzelczak, M., & Liz-Marzán, L. M. (2013). Tuning gold nanorod synthesis through prereduction with salicylic acid. *Chemistry of Materials*, *25*(21), 4232–4238.
- Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2015). A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *6*(21), 4270–4279.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., ... O’Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(9), 2951–2963.
- Selvamani, V. (2019). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*.
- Serkova, N. J. (2017). Nanoparticle-based magnetic resonance imaging on tumor-associated macrophages and inflammation. *Frontiers in Immunology*, *8*.
- Shen, S., Kong, F., Guo, X., Wu, L., Shen, H., Xie, M., ... Ge, Y. (2013). CMCTS stabilized Fe₃O₄ particles with extremely low toxicity as highly efficient near-infrared photothermal agents for in vivo tumor ablation. *Nanoscale*, *5*(17), 8056–8066.

Bibliografía

- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*, 217(1), 3–15.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3), 223–239.
- Singh, R. K., Kim, T.-H., Patel, K. D., Knowles, J. C., & Kim, H.-W. (2012). Biocompatible magnetite nanoparticles with varying silica-coating layer for use in biomedicine: Physicochemical and magnetic properties, and cellular compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(7), 1734–1742.
- Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., & Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*, 6(5), 446–465.
- Specenier, P., & Vermorken, J. B. (2013). Cetuximab: Its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics: Targets and Therapy*, 7(1), 77–90.
- Stamm, I., Mohr, M., Bridger, P. S., Schröpfer, E., König, M., Stoffregen, W. C., ... Menge, C. (2008). Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to Escherichia coli shiga toxin 1. *Infection and Immunity*, 76(11), 5381–5391.
- Stimmer, L., Dehay, S., Nemati, F., Massonnet, G., Richon, S., Decaudin, D., ... Johannes, L. (2014). Human breast cancer and lymph node metastases express Gb3 and can be targeted by STxB- vectorized chemotherapeutic compounds. *BMC Cancer*, 14, 916.
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69.
- Takenouchi, H. (2004). Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *Journal of Cell Science*, 117(17), 3911–3922.
- Tan, Y. H., Liu, M., Nolting, B., Go, J. G., Gervay-Hague, J., & Liu, G. Y. (2008). A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization. *ACS Nano*, 2(11), 2374–2384.
- Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*, 24(12), 1504–1534.
- Tang, J., Myers, M., Bosnick, K. A., & Brus, L. E. (2003). Magnetite Fe₃O₄ nanocrystals: Spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(30), 7501–7506.
- Tarragó-Trani, M. T., Jiang, S., Harich, K. C., & Storrie, B. (2006). Shiga-like Toxin Subunit B (SLTB)-Enhanced Delivery of Chlorin e6 (Ce6) Improves Cell

- Killing. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 527.
- Tavitian, B., Viel, T., Dransart, E., Nemati, F., Henry, E., Thézé, B., ... Johannes, L. (2008). In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. *Molecular Imaging*, 7(6), 239–247.
- Thakor, A. S., Jokerst, J. V., Ghanouni, P., Campbell, J. L., Mittra, E., & Gambhir, S. S. (2016). Clinically Approved Nanoparticle Imaging Agents. *The Journal of Nuclear Medicine*, 1833–1837.
- Tu, J., Li, N., Chi, Y., Qu, S., Wang, C., Yuan, Q., ... Qiu, S. (2009). The study of photoluminescence properties of Rhodamine B encapsulated in mesoporous silica. *Materials Chemistry and Physics*, 118(2–3), 273–276.
- Tyler, A., Johansson, A., Karlsson, T., Gudey, S. K., Brännström, T., Grankvist, K., & Behnam-Motlagh, P. (2015). Targeting glucosylceramide synthase induction of cell surface globotriaosylceramide (Gb3) in acquired cisplatin-resistance of lung cancer and malignant pleural mesothelioma cells. *Experimental Cell Research*, 336(1), 23–32.
- Vendrell, M., Maiti, K. K., Dhaliwal, K., & Chang, Y. T. (2013). Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 249–257.
- Vetrone, F., Naccache, R., Zamarrón, A., De La Fuente, A. J., Sanz-Rodríguez, F., Maestro, L. M., ... Capobianco, J. A. (2010). Temperature sensing using fluorescent nanothermometers. *ACS Nano*, 4(6), 3254–3258.
- Walkey, C. D., & Chan, W. C. W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2780–2799.
- Wan, J., Wang, J. H., Liu, T., Xie, Z., Yu, X. F., & Li, W. (2015). Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 5, 1–16.
- Wang, F., Li, X., Li, W., Bai, H., Gao, Y., Ma, J., ... Xi, G. (2018). Dextran coated Fe₃O₄ nanoparticles as a near-infrared laser-driven photothermal agent for efficient ablation of cancer cells in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering C*, 90, 46–56.
- Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., ... Lewis, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide: Pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology*, 152(1), 167–173.
- Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1.
- Williams, M. D. (2016). Determining Adequate Margins in Head and Neck Cancers: Practice and Continued Challenges. *Current Oncology Reports*, 18(9).
- Xavier, J., Vincent, S., Meder, F., & Vollmer, F. (2018). Advances in optoplasmonic

Bibliografía

- sensors - Combining optical nano/microcavities and photonic crystals with plasmonic nanostructures and nanoparticles. *Nanophotonics*, 7(1), 1–38.
- Yang, J., Fan, L., Xu, Y., & Xia, J. (2017). Iron oxide nanoparticles with different polymer coatings for photothermal therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(10).
- Yang, Q., & Lai, S. K. (2015). Anti-PEG immunity: Emergence, characteristics, and unaddressed questions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(5), 655–677.
- Yang, S. A., Choi, S., Jeon, S. M., & Yu, J. (2018). Silica nanoparticle stability in biological media revisited. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
- Yang, X., Fu, Z., Yang, Y., Zhang, C., Wu, Z., & Sheng, T. (2015). Optical Temperature Sensing Behavior of High-Efficiency Upconversion: Er^{3+} – Yb^{3+} Co-Doped $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$ Phosphor. *Journal of the American Ceramic Society*, 98(8), 2595–2600.
- Yildiz, I., & Yildiz, B. S. (2015). Applications of thermoresponsive magnetic nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–12.
- Yin, F., Zhang, B., Zeng, S., Lin, G., Tian, J., Yang, C., ... Yong, K.-T. (2015). Folic acid-conjugated organically modified silica nanoparticles for enhanced targeted delivery in cancer cells and tumor in vivo. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(29), 6081–6093.
- Yuan, G., Yuan, Y., Xu, K., & Luo, Q. (2014). Biocompatible PEGylated Fe_3O_4 nanoparticles as photothermal agents for near-infrared light modulated cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18776–18788.
- Zehentbauer, F. M., Moretto, C., Stephen, R., Thevar, T., Gilchrist, J. R., Pokrajac, D., ... Kiefer, J. (2014). Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 147–151.
- Zhang, F., Braun, G. B., Shi, Y., Zhang, Y., Sun, X., Reich, N. O., ... Stucky, G. (2010). Fabrication of $\text{Ag}@\text{SiO}_2@\text{Y}_2\text{O}_3$: Er nanostructures for bioimaging: Tuning of the upconversion fluorescence with silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 132(9), 2850–2851.
- Zhang, G., Gurtu, V., & Kain, S. R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(3), 707–711.
- Zhang, X., Zhang, J., Wang, H., Hao, Y., Zhang, X., Wang, T., ... Yang, B. (2010). Thermal-induced surface plasmon band shift of gold nanoparticle monolayer: morphology and refractive index sensitivity. *Nanotechnology*, 21(46), 465702.
- Zhang, Z., Wang, J., Nie, X., Wen, T., Ji, Y., Wu, X., ... Chen, C. (2014). Near Infrared Laser-Induced Targeted Cancer Therapy Using Thermoresponsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society*,

136(20), 7317–7326.

- Zhao, Y., Chen, H., Chen, X., Hollett, G., Gu, Z., Wu, J., & Liu, X. (2017). Targeted nanoparticles for head and neck cancers: overview and perspectives. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(6), 1–13.
- Zhuo, D., Li, X., & Guan, F. (2018). Biological roles of aberrantly expressed glycosphingolipids and related enzymes in human cancer development and progression. *Frontiers in Physiology*, 9, 1–9.

PUBLICACIONES

- Renero-Lecuna, C., Iturrioz-Rodríguez, N., González-Lavado, E., Padín-González, E., **Navarro-Palomares, E.**, Valdivia-Fernández, L., García-Hevia, L., Fanarraga, M.L., González-Legarreta, L. (2019). Effect of Size, Shape, and Composition on the Interaction of Different Nanomaterials with HeLa Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1–11
- **Navarro-Palomares, E.**, González-Saiz, P., Renero-Lecuna, C., Martín-Rodríguez, R., Aguado, F., González-Alonso, D., Fernández Barquín, L., González, J., Bañobre-López, M., Fanarraga, M. L., Valiente, R. Biodegradable dye-doped silica fluorescent coating: multifunctional nanoparticles for cell assays and toxicity reduction. *Nanoscale*, *en revisión*.
- Padín-González, E.*, **Navarro-Palomares, E.***, Valdivia, L., Iturrioz-Rodríguez, N., Correa-Duarte, M. A., Valiente, R., & Fanarraga, M. L. (2019). One-step custom-designed biocoating to trigger cancer cell single membrane receptor recognition. *En preparación*.
- **Navarro-Palomares, E.**, Padín-González, E., Bañobre-López, M., García-Hevia, L., Liz-Marzán, L., Villegas, J.C., Valiente, R., Fanarraga, M.L. Sneaking in through the back door: Shiga-toxin recognition moiety triggers functional biomimetics on nanoparticles. *En preparación*