



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Síntesis de nanoestructuras biopoliméricas  
para aplicaciones biomédicas

**D.<sup>a</sup> Marta García Fuster**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

Síntesis de nanoestructuras biopoliméricas  
para aplicaciones biomédicas

Autor: D.<sup>a</sup> Marta García Fuster

Director/es: D.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Gloria VÍllora Cano y D.<sup>a</sup> Mercedes García  
Montalbán





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Marta García Fuster

doctorando del Programa de Doctorado en

Química Básica y Aplicada

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Síntesis de nanoestructuras biopoliméricas para aplicaciones biomédicas

y dirigida por,

D./Dña. María Gloria Villora Cano

D./Dña. Mercedes García Montalbán

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 12 de junio de 2023

Fdo.: Marta García Fuster

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

<b>Responsable:</b>	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
<b>Legitimación:</b>	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
<b>Finalidad:</b>	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
<b>Destinatarios:</b>	No se prevén comunicaciones de datos
<b>Derechos:</b>	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

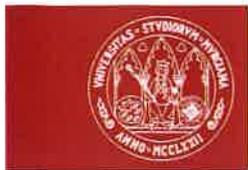
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Dña. M<sup>a</sup> Gloria Víllora Cano, Catedrática de Universidad del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, en calidad de directora de la presente Tesis Doctoral

**AUTORIZA:** La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS BIOPOLIMÉRICAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**” realizada por Dña. Marta García Fuster bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para obtener el Grado de Doctora por la Universidad de Murcia con la mención de Doctorado Internacional.

Murcia a 12 de mayo de 2023





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Dña. Mercedes García Montalbán, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, en calidad de directora de la presente Tesis Doctoral

**AUTORIZA:** La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS BIOPOLIMÉRICAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**” realizada por Dña. Marta García Fuster bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para obtener el Grado de Doctora por la Universidad de Murcia con la mención de Doctorado Internacional.

Murcia a 12 de mayo de 2023



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**D. Víctor Meseguer Zapata**, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia y Director de dicho Departamento

**INFORMA:** Que la Tesis Doctoral titulada “**SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS BIOPOLIMÉRICAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**” que presenta Dña. Marta García Fuster, ha sido realizada bajo la dirección de las Doctoras Dña. M<sup>a</sup> Gloria Villora Cano y Dña. Mercedes García Montalbán en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química y reúne los requisitos para su presentación.

Murcia a 12 de mayo de 2023

*Victor Meseguer*



Trabajo presentado para optar al Grado de  
**Doctora en Química Básica y Aplicada**  
por la Universidad de Murcia

Modalidad: Doctorado Internacional y  
Compendio de Publicaciones

Murcia, a 9 de mayo de 2023

**Marta García Fuster**  
Graduada en Biotecnología



La presente tesis ha estado subvencionada por la Unión Europea (FEDER/ERDF), el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación (proyectos con Ref. CTQ2017-87708-R y Ref. PID2020-113081RB-I00) y la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (proyecto con Ref. 20977/PI/18).

Durante el desarrollo de la presente tesis, su autora, Marta García Fuster, ha disfrutado de un contrato predoctoral FPI (Formación del Personal Investigador) del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación (Ref. PRE2018-086441).

De esta forma, queremos mostrar nuestro agradecimiento a dichas instituciones.



## **AGRADECIMIENTOS**

Sinceramente, no puedo creer lo rápido que ha pasado el tiempo. Han pasado cuatro años desde que empecé esta aventura, llena de altibajos. Cuando comencé mi tesis, nunca imaginé lo mucho que me enseñaría y lo mucho que crecería personalmente.

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que me han ayudado en la creación de este documento. Todo lo que he aprendido ha sido gracias a personas que jamás pensé que conocería. Sin embargo, temo que si las menciono a todas, necesitaría más páginas que la propia tesis. Así que, desde ahora, quiero disculparme por cualquier omisión que pueda existir en esta sección. También quiero pedir disculpas por mi falta de habilidad para expresar mis sentimientos y gratitud, ya que me quitaron demasiado pronto las entrañas.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora, Gloria Villora, quien confió ciegamente en mí para encargarme una tarea tan importante para con las células, así como por sus conocimientos transmitidos y las incontables horas dedicadas a ayudarme a resolver problemas en su despacho.

A mi codirectora, Mercedes García Montalbán, quien me ha dado un pequeño punto de apoyo para mover el mundo. Millones de gracias por apoyarme siempre y por confiar tanto en mí. Ojalá haber tenido más tiempo para trabajar y colaborar juntas. Creo que formamos un gran equipo.

También agradecer a Imane, quien recientemente apareció en mi vida. Gracias por enseñarme sobre tu cultura, por tantos y tantos consejos en el despacho, por tu infinita positividad y por ser un ejemplo para mí. Gracias también por animarme a tocar el piano, incluso cuando no tenía ni fuerzas ni ganas, y perdón por si no he estado a la altura ayudándote con tu adaptación al laboratorio y a Murcia. Espero tenerte siempre.

Por supuesto, agradecer a Guzmán, quien a pesar de abandonarme muy pronto, me enseñó a odiar menos a todos los dichosos aparatos de análisis que hay por el lab. Además, me enseñó cómo ser PhD (lo bueno y lo malo) y la pasión por lo que investigamos. Millones de gracias Guz, me hiciste el camino un poco más llevadero.

Quiero agradecer al departamento de Ingeniería Química entero por acogerme como una más a pesar de ser forastera en todos los sentidos. En especial gracias a Víctor y Juan por siempre estar atentos a mí.

Mi más sincero agradecimiento al SACE al completo. Sin ellas, esta tesis no tendría ningún tipo de sentido. Han sido tantas y tantas horas las que he estado entre esas paredes

que parecía mi sitio de trabajo. En especial, quiero agradecer a Tere por transmitirme su conocimiento y talento con la microscopía. Y a todas las chicas del SCT por siempre contar conmigo para todo y ayudarme. En especial a Toñi y Juana, de quien me llevo enormes consejos, y a Rosario por todas las horas en el citómetro, por no cansarse nunca de todas las veces que le he pedido ayuda (que no han sido pocas), por ayudarme tantísimo e incluso por reñirme y decirme que tenía que frenar cuando ni si quiera yo me lo permitía. Mención especial a Vero quien estuvo en los comienzos y a M<sup>a</sup> Jesús que me animaba todas las tardes que estuve en cultivos. Gracias infinitas a todas, de verdad.

A Alejandro J Paredes por su confianza y apoyo incondicional en mí y por dejarme formar parte de su grupo durante unos meses. To professor Ryan Donnelly and his wonderful research group. To Jiawen (Iris), my little Doraemon, for helping me in the lab and always cheering me up, thank you very much for everything. You will always have a home in Spain! I would also like to thank the rest of the group, especially Cami, Subrin, Anna, Alexsandra, Anjali, Juan Luis, Martina (bebesita, vas a conseguir todo lo que te propongas) who made my stay in Belfast less terrifying, you made the weather and food something better.

A todas las personas que he conocido en la hora de la comida a pesar de negarme a conocer gente nueva y aumentar mi pequeño círculo de comensales. Gracias a todos por vuestra amistad. Sobre todo, quisiera agradecer especialmente a Edu y Mar por sus ánimos constantes y sabios consejos, que me han sido de gran ayuda, especialmente en la etapa final. Infinitas gracias por vuestra sabiduría y por todas las risas compartidas. Creo que, finalmente, no iré a Canadá.

Quisiera agradecer especialmente a mi murcianico mayor, taxista personal, paragüero y matador de avispas, Chema. Quien espero llevarme para siempre. Único en su especie, con un corazón enorme y mejor DOC. Muchas gracias Chemix por todos tus consejos y por tu grandísimo apoyo en todos estos años y por qué no decirlo por aguantar todas las veces que me he metido contigo y tu forma de no entender lo que te digo (waiting for la explicación de que en realidad sí que las entiendes). ¡Eres un grande!

A mis amigas y amigos pedirles perdón por mis ausencias durante estos años. Y darles las gracias por mantenerme en mayor o menor medida en sus vidas a pesar de todo. Gracias por siempre preguntar y preocuparos por mí. Gracias Chu por ser casa y no dejar que ni el tiempo ni la distancia nos separe. A mi amiga Laura, por todas esas charlas infinitas arreglando el mundo con una cerveza en la mano. Por hablarme siempre claro y

de verdad, por estar siempre. Gracias también por apoyarme y emocionarte más que yo por mis logros. Cómo te quiero, Lau.

Agradecer a toda mi familia primas, tíos y sobrinos. A mi hermano Íñigo y mis primos/hermanos Luis, Borja y Belén por el apoyo incondicional y por la confianza en mí y mis conocimientos que ni yo misma tengo. Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis mamás, Luli y Anu. No puedo imaginar mi vida sin vosotras. Vuestra presencia en mi vida ha sido fundamental, no solo por vuestro amor incondicional, sino también por ser un modelo de cómo quiero ser de mayor. Nos habéis criado y protegido excepcionalmente bien a los cuatro. A pesar de las dificultades y adversidades que hemos pasado en la vida, siempre habéis sabido ver el lado positivo de las cosas y nos habéis empujado a seguir adelante. Sois un gran ejemplo de mujeres fuertes y capaces, que se han hecho a sí mismas. Soy consciente de la inmensa suerte que tengo y que tenemos todos los que compartimos la vida con vosotras. Ojalá seáis eternas, porque os necesitamos siempre. ¡Os quiero mucho mamis!

A los que ya no están. A mi iaia especialmente, de quién heredé la creatividad y poder así pertenecer a Ravenclaw. A mi padre, quien echo de menos todos los días de mi vida desde que no está. Con la inocencia de una niña de 15 años le dije que de mayor conseguiría curarlo de cáncer. Hoy en día sé que la cura del cáncer es imposible, pero espero haber podido aportar mi granito de arena a la causa con esta tesis. Ojalá estuvieras aquí para poder contártelo.

Finalmente, gracias a ti, Fran, por ser el hombre más maravilloso que he conocido jamás. Doy gracias por haberte conocido hace 7 años y no haberte soltado nunca desde entonces. Te quiero tanto que no sé ni cómo expresarlo. Millones de gracias por ser tan bueno, generoso y honrado y por aguantarme, como dice mi madre. Sé que no es nada fácil, pero muchísimas gracias por tu paciencia. Sé que soy mejor persona desde que te conozco y ojalá pasar el resto de mi vida a tu lado. Gracias por apoyarme en todos y cada uno de mis sueños, por animarme a seguir remando, por abrazarme todos los días que llegaba llorando a casa. Por enseñarme los kebabs y por engordar de felicidad a mi lado. Gracias por querer formar conmigo una familia de gatos pelirrojos. Por estar todas las mañanas de mi vida, por hacerme de comer y por tu sentido del humor, ese que sale a relucir incluso cuando menos lo merezco. Te quiero mucho bonito. Gracias también a tus padres y hermano y amigos por acogerme en la familia como una más.

¡¡Muchísimas gracias a todos!!



**A mi padre**



Los resultados de la labor de investigación desarrollada durante la presente Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de varios artículos en revistas científicas, dos capítulos de libro y diversas comunicaciones (oral o póster) a congresos de ámbito nacional e internacional.

#### **Artículos que contiene la Tesis Doctoral (5):**

1. **M.G Fuster**, G. Carissimi, M.G. Montalbán, G. Villora. Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles. *Nanomaterials*. 10 (4), 718 (2020)
2. **M.G. Fuster**, G. Carissimi, M.G. Montalbán, G. Villora. Antitumor activity of rosmarinic acid-loaded silk fibroin nanoparticles on HeLa and MCF-7 cells. *Polymers*. 13(18):3169. (2021)
3. **M.G. Fuster**, M.G. Montalbán, I. Moulefera, G. Villora, D. L. Kaplan. Folic acid-modified Ibrutinib-loaded silk fibroin nanoparticles for cancer cell therapy with over-expressed folate receptor. *Pharmaceutics*. 15(4):118. (2023)
4. **M.G. Fuster**, I. Moulefera, M.N. Muñoz, M.G. Montalbán, G. Villora. Synthesis of Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Solutions for Biomedical Applications. *Polymers*. 15(2):382. (2023)
5. **M. G. Fuster**, M. G. Montalbán, G. Carissimi, B. Lima, G. E. Feresin, M. Cano, J. J. Giner-Casares, J. J. López-Cascales, R. D. Enriz, G. Villora. Antibacterial effect of chitosan-gold nanoparticles and computational modelling of the interaction between chitosan and a lipid bilayer model. *Nanomaterials*. 10(12):2340. (2020)

#### **Artículos relacionados con la Tesis Doctoral (4):**

1. M.A. Pujante-Galián, S.A. Pérez, M.G. Montalbán, G. Carissimi, **M.G. Fuster**, G. Villora, G. García. p-Cymene Complexes of Ruthenium(II) as Antitumor Agents. *Molecules*. 25(21):5063. (2020).
2. M.A. Asensio Ruiz, **M.G. Fuster**, T. Martínez Martínez, M.G. Montalbán, J.L. Cenis, G. Villora, A.A. Lozano-Pérez. The Effect of Sterilization on the Characteristics of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers*. 14(3):498. (2022)
3. **M.G. Fuster**, I. Moulefera, M.G. Montalbán, J. Pérez, G. Villora, G. García. Synthesis and Characterization of New Ruthenium (II) Complexes of

Stoichiometry [Ru(p-Cymene)Cl<sub>2</sub>L] and Their Cytotoxicity against HeLa-Type Cancer Cells. *Molecules*. 27 (21), 7264. (2022)

4. M. Chaala, F.Z. Sebba, M.G. Fuster, I. Moulefera, **M.G. Montalbán**, G. Carissimi, G. Villora. Accelerated Simple Preparation of Curcumin-Loaded Silk Fibroin/Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers*. 15(3), 504. (2023)

### **Capítulos de libro (2):**

1. G. Carissimi, M.G. Montalbán, **M.G. Fuster**, G. Villora. Nanoparticles as drug delivery system. ISBN: 978-1-80355-084-8 Editorial: IntechOpen. (2021)
2. G. Carissimi, M.G. Montalbán, **M.G. Fuster**, G. Villora. Silk fibroin nanoparticles: Synthesis and applications as drug nanocarriers. ISBN: 978-1-80355-084-8 Editorial: IntechOpen. (2021)

### **Comunicaciones a Congresos de ámbito nacional e internacional (14):**

1. **M.G. Fuster**, M.G. Montalbán, G. Villora, A.J. Paredes. Functionalized curcumin nanocrystals aimed to accumulate in cancer tissues. Academy of Pharmaceutical Sciences, Belfast (United Kingdom), 7th – 9th September 2022, Póster.
2. **M.G. Fuster**, M.G. Montalbán, C.D. Ríos, G. Villora. Improvement of the antitumor activity of ibrutinib in HeLa, SKBR and BT-474 cell lines. II Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, Murcia (Spain), 24th – 25th March 2022. Oral.
3. **M.G. Fuster**, M.G. Montalbán, L. Soto, G. Villora. Folic functionalized silk fibroin nanoparticles for targeted cancer therapy. II Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, Murcia (Spain), 24th – 25th March 2022. Póster.
4. **M.G. Fuster**, M.N. Muñoz-Vicente, I. Moulefera, M.G. Montalbán, G. Villora. Synthesis of Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Solutions for Biomedical Applications. VII Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia, Online, 4th – 6th July 2022. Oral.
5. G. Villora, M. Chaala, **M.G. Fuster**, G. Carissimi, C.D. Ríos, M.G. Montalbán. Synthesis and characterization of curcumin-loaded silk fibroin/hyaluronic acid hydrogels. RSEQ Symposium, OnLine, 27th-30th September 2021. Póster.

6. M.G. Montalbán, **M.G. Fuster**, G. Carissimi, C.D. Ríos, G. Villora. Silk fibroin-based nanoplatforms as drug delivery carriers for effective cancer treatment. RSEQ Symposium, online, 27th-30th September 2021. Oral.
7. **M.G. Fuster**, G. Carissimi, M.G. Montalbán, G. Villora. Antitumor Activity of Rosmarinic Acid-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles on HeLa and MCF-7 Cells. VI Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia, Online, 21th – 24th July 2021.Oral.
8. G. Carissimi, **M.G. Fuster**, M.G. Montalbán, M. Chaala, G. Villora. Infrared study of the secondary structure of silk fibroin during nanoparticles production. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Oral.
9. G. Carissimi, A. A. Lozano-Pérez, M.G. Montalbán, S.D. Aznar-Cervantes, **M.G. Fuster**, J.L. Cenis, G. Villora. Effect of Degumming Methods on the Structure and Properties of Silk Fibroin. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Póster.
10. **M.G. Fuster**, G. Carissimi, M.G. Montalbán, M.A. Pujante, M. Chaala, G. Villora. Improving anticancer therapy by Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Póster.
11. **M.G. Fuster**, G. Carissimi, M.G. Montalbán, M. Chaala, M. A. Pujante, G. Villora. Green synthesis of Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Póster.
12. M.G. Montalbán, G. Carissimi, **M.G. Fuster**, M. Chaala, F. Pedreño, G. Villora. Analysis of the behavior of silk fibroin nanoparticles under DLVO theory. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Póster.
13. M.G. Montalbán, G. Carissimi, **M.G. Fuster**, M. Chaala, C. Serrano, G. Villora. Effect of Ionic Strength on the Size of Silk Fibroin Nanoparticles. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Póster.
14. G. Carissimi, M.G. Montalbán, **M.G. Fuster**, G. Villora, A. Barth. Direct Quantification of Drug Loading Content in Polymeric Nanoparticles by Infrared Spectroscopy. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers, online, 22nd – 23rd October 2020. Oral.



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
1. Nanotecnología y nanomedicina .....	17
2. Tipos de nanopartículas.....	19
2.1. Nanopartículas orgánicas.....	20
2.1.1. Nanopartículas de fibroína de seda .....	21
2.1.2. Nanopartículas de celulosa.....	24
2.1.3. Nanopartículas de quitosano .....	26
3. Ventajas del uso de nanoestructuras para la distribución de fármacos .....	28
3.1. Transporte de fármacos insolubles .....	29
3.2. Liberación controlada y/o sostenida .....	30
3.3. Liberación dirigida.....	31
4. Diseño de nanopartículas terapéuticas .....	35
4.1. Tamaño y polidispersidad.....	37
4.2. Morfología .....	38
4.3. Carga superficial.....	39
5. Nanofármacos aprobados por la FDA.....	41
<b>1. IMPROVING ANTICANCER THERAPY WITH NARINGENIN-LOADED SILK FIBROIN NANOPARTICLES</b> .....	<b>57</b>
<b>2. ANTITUMOR ACTIVITY OF ROSMARINIC ACID-LOADED SILK FIBROIN NANOPARTICLES ON HELA AND MCF-7 CELLS</b> .....	<b>77</b>
<b>3. FOLIC ACID-MODIFIED IBRUTINIB-LOADED SILK FIBROIN NANOPARTICLES FOR CANCER CELL THERAPY WITH OVEREXPRESSED FOLATE RECEPTOR SUMMARY</b> .....	<b>99</b>
<b>4. SYNTHESIS OF CELLULOSE NANOPARTICLES FROM IONIC LIQUID SOLUTIONS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS</b> .....	<b>131</b>
<b>5. ANTIBACTERIAL EFFECT OF CHITOSAN-GOLD NANOPARTICLES AND COMPUTATIONAL MODELLING OF THE INTERACTION BETWEEN CHITOSAN AND A LIPID BILAYER MODEL</b> .....	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>181</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>187</b>
<b>ANEXO. MATERIALES Y MÉTODOS DE CULTIVOS CELULARES</b> .....	<b>193</b>

## ABREVIATURAS

AAE	Equivalentes de ácido ascórbico
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR-FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada
AuNPs	Nanoparículas de oro
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
CFU	Unidades formadoras de colonias
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CME	Endocitosis mediada por Clatrina
CNDO	Omisión total del solapamiento diferencial del inglés <i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>
CNPs	Nanopartículas de celulosa
Cs	Quitosano
DAM	Mecanismo de acción dinámico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLC	Contenido de carga de fármaco del inglés <i>Drug Loading Content</i>
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMAC	N-dimetilacetamida
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMI	1,3-dimetil-2- imidazolidinona
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
DTA	Análisis térmico diferencial
EDC	Clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EE	Eficacia de la encapsulación
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMIMAc o [emim <sup>+</sup> ][acetate <sup>-</sup> ] o [emim <sup>+</sup> ][CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazolio
EPR	Efecto de permeabilidad y retención mejorada
EURL	<i>European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing</i>
FA	Ácido fólico
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FESEM	Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo del inglés <i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i>
FITC	Isotiocianato-5 de fluoresceína
FS	Fibroína de Seda
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2 del inglés <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HMw	Alto peso molecular del inglés <i>High Molecular Weight</i>

HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento del inglés High-Performance Liquid Chromatography
IB	Ibrutinib
IC50	La mitad de la concentración inhibitoria máxima
IL	Líquidos iónico
IP	yoduro de propidio
LMw	Bajo peso molecular del inglés <i>Low Molecular Weight</i>
mAbs	Anticuerpos monoclonales
MBC	Concentración bactericida mínima
MIC	Concentración inhibitoria mínima
MMw	Peso molecular medio del inglés <i>Medium Molecular Weight</i>
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAR	Naringenina
NDDS	Nuevos sistemas de administración de fármacos del inglés <i>Novel Drug Delivery Systems</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMMO	N-óxido de N-metilmorfolina
PALS	Análisis de fase dispersión de luz del inglés <i>Phase Analysis Light Scattering</i>
PBS	Solución tamponada con fosfato del inglés <i>Phosphate-Buffered Solution</i>
PCL	Policaprolactona
PdI	índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PFA	paraformaldehído
PI	Yoduro de porpidio
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli-ácido láctico-co-glicólico
RA	Ácido Rosmarínico
RES	Sistema reticuloendotelial
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SDS	Sulfato de sodiododecil anionizado
SF	Fibroína de Seda
SFNs	Nanopartículas de fibroína de seda
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TfR	Receptor de transferrina
TGA	Análisis termogravimétrico
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
VLMw	Muy bajo peso molecular del inglés <i>Very Low Molecular Weight</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Z-average	Diámetro hidrodinámico medio

## LÍNEAS CELULARES

BT-474	Células humanas de cáncer de mama
EA.hy926	Células humanas endoteliales de cordón umbilical
HeLa	Células humanas de carcinoma de cuello uterino
MCF7	Células humanas de cáncer de mama
SKBR3	Células humanas de cáncer de mama

## CEPAS BACTERIANAS

CI-EC	<i>Escherichia coli</i> 11046 - gramnegativa
EC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - gramnegativa
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 - grampositiva resistente a la meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 - grampositiva sensible a la meticilina

# Resumen

## RESUMEN

Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina moderna es encontrar tratamientos eficaces para enfermedades complejas y mejorar la calidad de vida de los pacientes que las padecen. Una de estas enfermedades es el cáncer que, según datos de la Organización Mundial de la Salud, provocó casi 10 millones de muertes durante el año 2020. Durante décadas se han desarrollado fármacos efectivos para su tratamiento, pero presentan varias desventajas, principalmente su efecto tóxico sobre células sanas y su baja biodisponibilidad. Esto reduce considerablemente la calidad de vida de los pacientes y la eficacia de los medicamentos. Por este motivo, desde hace algunos años, se están estudiando mecanismos de transporte selectivo de fármacos que minimicen los efectos secundarios y promuevan la acción terapéutica sobre las células cancerosas afectando mínimamente a los tejidos sanos. El uso de la nanotecnología ha generado importantes beneficios en campos relacionados con la medicina. Las estructuras a nanoescala permiten que los fármacos se carguen y se dirijan a tejidos específicos, lo que permite una liberación controlada, reduce la toxicidad y aumenta la eficacia. A nivel celular, el comportamiento de las nanopartículas depende de muchos factores, pero el tamaño de las partículas (menos de 200 nm) y la distribución del tamaño se encuentran entre las características más importantes que determinarán el destino biológico, la toxicidad y la distribución *in vivo*.

Por otra parte, el aumento global de las epidemias y las tasas de mortalidad asociadas con las bacterias multirresistentes ha convertido la lucha contra las enfermedades infecciosas en un motivo de preocupación a nivel mundial. La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema importante porque estas infecciones a veces son imposibles de tratar y causan la muerte de muchas personas en todo el mundo. Este hecho ha conducido a una búsqueda urgente de agentes antibacterianos efectivos con nuevos mecanismos para tratar infecciones. Al igual que en el caso del tratamiento del cáncer, la nanotecnología, y especialmente las nanopartículas, pueden ofrecer buenas alternativas a los antibióticos.

Hasta ahora se han utilizado varios materiales para sintetizar nanopartículas incluyendo lípidos, polímeros naturales o sintéticos o materiales inorgánicos. Desde hace pocos años, los intereses en las investigaciones se han centrado en el uso de biopolímeros, los cuales se conocen por ser altamente biocompatibles, biodegradables e inoctrinos a la vez que han demostrado ser adecuados para encapsular una gran variedad de fármacos. De entre todos los biopolímeros disponibles, la fibroína de seda, la celulosa y el quitosano son los que se han empleado en esta tesis.

La fibroína de seda tiene una gran capacidad para cargar, transportar y administrar una amplia gama de moléculas bioactivas, lo que la convierte en un excelente material para la administración de fármacos. En esta tesis, se han evaluado dos fármacos de origen natural (naringenina y ácido rosmarínico) y un fármaco de origen sintético (ibrutinib) cargados en fibroína de seda. Los mejores resultados en cuanto a bioactividad de las nanopartículas cargadas se han obtenido con ibrutinib por lo que estas nanopartículas han sido posteriormente funcionalizadas con ácido fólico para poder dirigir las de forma específica a células tumorales, las cuales sobreexpresan receptores folato, y así disminuir o eliminar los efectos secundarios sobre las células sanas.

Por otro lado, la celulosa también es un biopolímero con excelentes propiedades para ser utilizado como portador de fármacos. En este trabajo, también se han sintetizado nanopartículas de celulosa a partir de disoluciones de celulosa microcristalina en líquido iónico con un proceso respetuoso con el medio ambiente. Por primera vez, se ha estudiado la bioactividad de nanopartículas de celulosa obtenidas con este procedimiento en células sanas y tumorales con el objetivo de poder emplearlas posteriormente como vehículo de fármacos.

Por último, el quitosano es un biopolímero con propiedades antibacterianas las cuales, unidas al potencial antimicrobiano del oro, permiten el diseño de nanopartículas para el tratamiento eficaz de infecciones bacterianas. Se han sintetizado nanopartículas de quitosano y oro con acción bactericida. El quitosano cumple una doble misión: reduce la sal de oro de partida y estabiliza las nanopartículas obtenidas. También se ha desarrollado un modelo de simulación mediante dinámica molecular para evaluar la interacción entre el quitosano y la membrana bacteriana, que ha sido comparado con los resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas obtenidos de forma experimental.

Por tanto, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la síntesis y caracterización de nanopartículas biopoliméricas para su uso en biomedicina y, concretamente, como transportadores de fármacos antitumorales y antibacterianos.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han permitido profundizar en el desarrollo y la caracterización de nuevas nanoestructuras para aplicaciones biomédicas en el ámbito del tratamiento del cáncer e infecciones bacterianas. Con toda seguridad, algunos de estos resultados contribuirán al diseño de futuros estudios *in vivo*.

# Summary

## SUMMARY

One of the biggest challenges facing modern medicine is to find effective treatments for complex diseases and to improve the quality of life for patients suffering from them. One of these diseases is cancer which, according to data from the World Health Organization, caused almost 10 million deaths during the year 2020. Effective drugs have been developed for decades, but they have several disadvantages, mainly their toxic effect on healthy cells and their low bioavailability. This significantly reduces patients' quality of life and the effectiveness of treatments. For this reason, during the last years, selective drug transport mechanisms have been studied to minimize side effects and promote therapeutic action on cancer cells without significant effect on healthy tissues. The use of nanotechnology has generated relevant benefits in medical-related fields. Nanoscale structures allow drugs to be loaded and targeted to specific tissues, enabling controlled release, reducing toxicity and increasing efficacy. At the cellular level, the behavior of nanoparticles depends on many factors, but particle size (less than 200 nm) and size distribution are among the most important characteristics that will determine biological fate, toxicity and *in vivo* distribution.

Additionally, the global increase in epidemics and mortality rates associated with multidrug-resistant bacteria has made combating infectious diseases a global concern. Bacterial resistance to antibiotics is a major problem, as some infections become untreatable and cause numerous deaths worldwide. Consequently, there is an urgent search for effective antibacterial agents with new mechanisms to treat infections. Similarly to cancer treatment, nanotechnology, and especially nanoparticles, may offer good alternatives to antibiotics. However, the details of the antibacterial mechanisms of nanoparticles are not yet fully understood.

Until now, several materials have been used to synthesize nanoparticles including lipids, natural or synthetic polymers or inorganic materials. In recent years, research interests have focused on the use of biopolymers, which are known to be highly biocompatible, biodegradable and innocuous while they have shown to be suitable for encapsulating a wide variety of drugs. Among all the biopolymers available, silk fibroin, cellulose and chitosan are those that have been used in this thesis.

Silk fibroin has a high capacity for loading, transporting and delivering a wide range of bioactive molecules, making it an excellent material for drug delivery. In this thesis, two drugs of natural origin (naringenin and rosmarinic acid) and a drug of synthetic origin

(ibrutinib) loaded in silk fibroin nanoparticles have been evaluated. The best results in terms of bioactivity of the loaded nanoparticles have been obtained with ibrutinib so these nanoparticles have been subsequently functionalized with folic acid to be able to direct them specifically to tumor cells, which overexpress the folate receptor, and, in this way, to reduce or to eliminate side effects on healthy cells.

On the other hand, cellulose is also a biopolymer with excellent properties to be used as a drug carrier. In this work, cellulose nanoparticles have also been synthesized from microcrystalline cellulose solutions in ionic liquid with an environmentally friendly process. For the first time, the bioactivity of cellulose nanoparticles obtained with this procedure in healthy and tumor cells has been studied with the aim of being able to use them later as a drug vehicle.

Finally, chitosan is a biopolymer with antibacterial properties which, along with the antimicrobial potential of gold, allow the design of nanoparticles for the effective treatment of bacterial infections. In this thesis, chitosan-gold nanoparticles with bactericidal action have been synthesized. Chitosan fulfills a double mission: it reduces the starting gold salt and stabilizes the nanoparticles obtained. A simulation model using molecular dynamics has also been developed to evaluate the interaction between chitosan and the bacterial membrane, which has been compared with the results of the bactericidal activity of the nanoparticles experimentally obtained.

Therefore, the main objective of this doctoral is to synthesize and characterize biopolymeric nanoparticles for biomedical applications, specifically as carriers of antitumor and antibacterial drugs.

The results obtained in this doctoral thesis have contributed to a more detailed understanding of the development and characterization of new nanostructures for biomedical applications in the field of cancer treatment and bacterial infections. Some of these results will certainly contribute to the design of future *in vivo* studies.

# **Objetivos y estructura del trabajo**

## OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como objetivo global la síntesis y caracterización de nanoestructuras biopoliméricas para su aplicación en biomedicina, fundamentalmente como nanoportadores de fármacos anticancerígenos y antibacterianos.

Este objetivo global se ha desglosado en varios objetivos específicos que han sido clasificados en tres grupos en función de la naturaleza del biopolímero portador y de su aplicación.

### 1. *Objetivos relacionados con la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con fármacos anticancerígenos.*

- 1.1. Sintetizar nanopartículas de fibroína de seda a partir de disoluciones de la fibroína en el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y precipitación en un antisolvente (metanol).
- 1.2. Sintetizar nanopartículas de fibroína de seda cargadas con naringenina, ácido rosmarínico o ibrutinib mediante incubación de las nanopartículas de fibroína de seda sintetizadas en el subobjetivo anterior en disoluciones concentradas de los fármacos.
- 1.3. Evaluar los parámetros característicos de la carga (Contenido de Carga de Fármaco y Eficiencia de Encapsulación) en las nanopartículas obtenidas.
- 1.4. Caracterizar física, química y morfológicamente las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con el fármaco: diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta, morfología, estructura química y estabilidad térmica.
- 1.5. Analizar la liberación de fármaco *in vitro* en medios fisiológicos de las nanopartículas cargadas.
- 1.6. Estudiar la bioactividad de las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con el fármaco en líneas celulares tumorales y sanas.
- 1.7. Diseñar y ensayar diferentes procedimientos de funcionalización de las nanopartículas para obtener estructuras para la liberación dirigida de fármacos.

### 2. *Objetivos relacionados con la síntesis de nanopartículas de celulosa.*

- 2.1. Sintetizar nanopartículas de celulosa a partir de disoluciones de celulosa en el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio y precipitación en un antisolvente (acetonitrilo).
- 2.2. Caracterizar física, química y morfológicamente las nanopartículas de celulosa: diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta, morfología, estructura química, cristalinidad y estabilidad térmica.

- 2.3. Evaluar la influencia de las variables de operación en el proceso de síntesis (tipo de celulosa, temperatura de la disolución y volumen de antisolvente) sobre las propiedades de las nanopartículas.
- 2.4. Estudiar la bioactividad de las nanopartículas de celulosa en líneas celulares tumorales y sanas.
3. *Objetivos relacionados con la síntesis de nanopartículas antibacterianas de oro y quitosano.*
  - 3.1. Sintetizar nanopartículas de oro y quitosano empleando disoluciones ácidas de quitosano como agente estabilizante de las nanopartículas y reductor de la sal de oro de partida.
  - 3.2. Caracterizar física, química y morfológicamente las nanopartículas de quitosano y oro: diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta, morfología y estructura química.
  - 3.3. Evaluar la influencia de las variables de operación en el proceso de síntesis (peso molecular del quitosano, concentraciones de quitosano y oro y medio de reacción) sobre las propiedades de las nanopartículas.
  - 3.4. Desarrollar simulaciones mediante dinámica molecular para estudiar la interacción entre el quitosano y la membrana bacteriana.
  - 3.5. Determinar experimentalmente la actividad antibacteriana de las nanopartículas y compararla con el modelo desarrollado en el subobjetivo anterior.

## ESTRUCTURA DEL TRABAJO

La presente tesis doctoral se presenta en la modalidad de compendio de publicaciones donde cada uno de los artículos científicos constituye un capítulo de la tesis. A continuación, se muestra un resumen del contenido de cada apartado del trabajo:

La tesis comienza con una sección de **Introducción** en la que se presentan los principales conceptos que se abordan en los capítulos de la tesis. En primer lugar, se describe el concepto de nanotecnología y se realiza una breve reseña acerca de su aplicación en el ámbito de la medicina. En segundo lugar, se detallan las características y aplicaciones principales de los tipos de nanopartículas estudiados en la presente tesis en función del biopolímero empleado para su síntesis. Seguidamente, se explican las ventajas del uso de nanoestructuras para la distribución de fármacos enfocados al tratamiento del cáncer y de infecciones bacterianas. A continuación, se proporcionan pautas a tener en cuenta a la hora de diseñar nanopartículas terapéuticas relacionadas con su tamaño, morfología y carga superficial de forma con el objetivo de aumentar su eficacia. Para concluir, se describen algunos ejemplos de nanofármacos aprobados por la “Food and Drug Administration” (FDA).

Los **Capítulos 1, 2 y 3** se centran en la síntesis y caracterización de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con fármacos naturales (**Capítulos 1 y 2**, naringenina y ácido rosmarínico, respectivamente) y sintéticos (**Capítulo 3**, ibrutinib). En los tres capítulos el éxito de la carga ha sido evaluado mediante la determinación de los parámetros característicos: Contenido de Carga de Fármaco (DLC, “Drug Loading Content”) y Eficiencia de Encapsulación (EE). También se ha llevado a cabo la caracterización física y química de las nanopartículas cargadas mediante la determinación de su diámetro hidrodinámico, potencial zeta y estructura secundaria mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y espectroscopía infrarroja y se ha analizado su estabilidad térmica mediante análisis termogravimétrico (TGA). La morfología de las nanopartículas ha sido observada mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM). Por otro lado, se ha estudiado la liberación *in vitro* de los fármacos en condiciones fisiológicas en tampón fosfato salino (PBS) y se ha determinado la bioactividad de las nanopartículas en células. Además, en el **Capítulo 3** se han diseñado y sintetizado nanopartículas de fibroína de seda funcionalizadas con ácido fólico para generar así nanoportadores de fármacos dirigidos a células específicas, en este caso, a células tumorales las cuales sobreexpresan el receptor folato. Por este motivo, estas

nanopartículas (cargadas con ibrutinib) han sido sometidas a un estudio más amplio sobre su actividad en células tumorales y sanas que en los **Capítulos 1 y 2**.

El **Capítulo 4** está enfocado al estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de celulosa para su uso futuro en aplicaciones biomédicas. En primer lugar, se ha optimizado el proceso de síntesis modificando las condiciones de operación (tipo de celulosa, temperatura de precipitación y antisolvente). Al igual que en los **Capítulos 1, 2 y 3**, se ha llevado a cabo la caracterización física y química de las nanopartículas mediante la determinación de su diámetro hidrodinámico, potencial zeta y estructura secundaria mediante DLS y espectroscopía infrarroja y se ha analizado su estabilidad térmica mediante TGA. La morfología de las nanopartículas ha sido observada mediante FESEM y su citotoxicidad *in vitro* ha sido determinada en células tumorales y sanas.

El **Capítulo 5** recoge el estudio sobre la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y quitosano como agentes antibacterianos. En primer lugar, se ha estudiado la influencia de las condiciones de operación durante la síntesis de las nanopartículas (peso molecular del quitosano, concentraciones de quitosano y oro y naturaleza del medio de reacción). Las nanopartículas se han caracterizado en base a su estructura fisicoquímica (diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y estructura química) y su morfología. En este capítulo se ha desarrollado un modelo de simulación basado en dinámica molecular para profundizar en el mecanismo de acción del quitosano cuando entra en contacto con la membrana bacteriana. De forma paralela, se ha determinado de forma experimental la actividad antibacteriana de las nanopartículas en cuatro cepas bacterianas de interés y los resultados han sido comparados con los proporcionados por el modelo de simulación.

En la Sección **Conclusiones/Conclusions** se recogen las principales conclusiones extraídas de los Capítulos 1, 2, 3, 4 y 5 de la presente tesis doctoral.

Para finalizar, se incluye un **Anexo** con los materiales y métodos empleados en los ensayos con cultivos celulares con el objetivo de proporcionar una descripción detallada de las técnicas empleadas permitiendo una comprensión crítica de los resultados y la reproducibilidad de los ensayos.

# Introducción

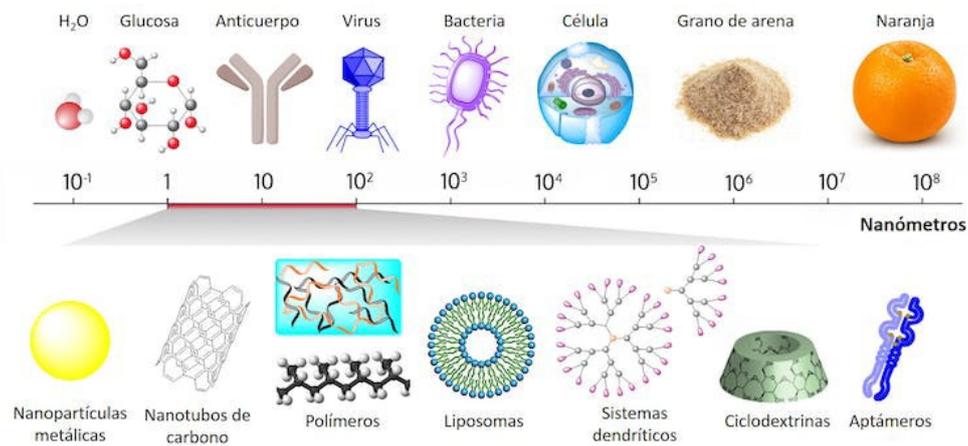
“Hay otras maneras de volar, no solo con escobas mágicas” - Luna Lovegood

## INTRODUCCIÓN

### *1. Nanotecnología y nanomedicina*

Es importante distinguir entre los conceptos de nanociencia y nanotecnología. La nanociencia es la convergencia de la biología, la física y la ciencia de los materiales, que se ocupa de la manipulación de materiales a escala atómica y molecular; mientras que la nanotecnología es la tecnología que la aplica siendo ésta una de las tecnologías más prometedoras del siglo XXI. La *National Nanotechnology Initiative* (NNI) de Estados Unidos define la nanotecnología como “la ciencia, la tecnología y la ingeniería que se desarrollan a escala nanométrica (de 1 a 100 nm) (Figura 1), con aplicabilidad en una amplia gama de campos, desde la química, la física, la ingeniería y la electrónica hasta la biología y la medicina. La nanotecnología no consiste simplemente en trabajar con dimensiones cada vez más pequeñas, sino que el trabajo a nanoescala permite a los científicos comprender y utilizar las propiedades físicas, químicas, mecánicas y ópticas únicas de los materiales que se producen a esta escala [1].

El físico estadounidense y Premio Nobel Richard Feynman fue quien introdujo el concepto de nanotecnología en 1959. Durante la reunión anual de la Sociedad Americana de Física, Feynman presentó una conferencia titulada "*There's Plenty of Room at the Bottom*" (Hay mucho espacio allá abajo) en el Instituto Tecnológico de California (Caltech), en la que planteaba la manipulación de la materia a escala muy pequeña y destacaba que no hay razones en las leyes de la física que impidan construir estructuras colocando átomo a átomo de una forma específica. En esta conferencia, Feynman también describió una visión del uso de máquinas para construir otras máquinas más pequeñas hasta el nivel molecular [2], considerándose así el padre de la nanotecnología. Años más tarde, en 1974, el científico japonés Norio Taniguchi, definió el término “nanotecnología” por primera vez como “el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales en función de un átomo o una molécula” [3].



**Figura 1.** Representación del tamaño de los nanomateriales [4].

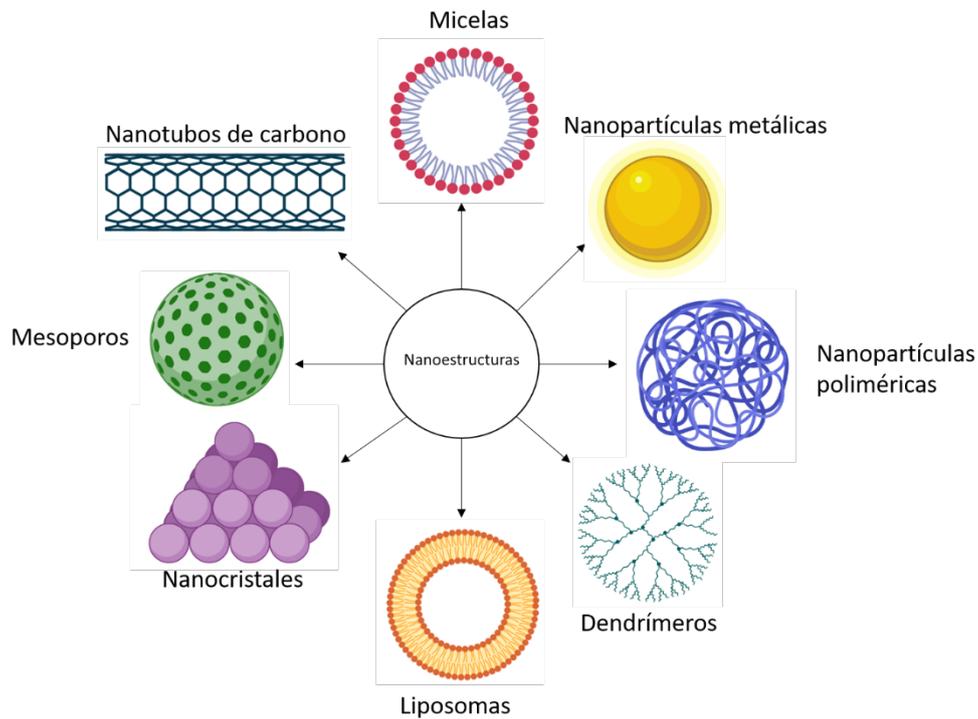
El potencial de la nanotecnología se deriva de la capacidad de manipular materiales a nivel molecular y atómico, lo que permite controlar las propiedades físicas y químicas mediante la creación de estructuras a nivel molecular que pueden combinarse en estructuras funcionales más grandes.

El progreso de la nanociencia y de la nanotecnología se ha ampliado en distintas direcciones en función del campo de la ciencia al que se aplicaba. En química, desde la materia de tamaño micro a los puntos de carbono, “carbon dots”, de distribución de tamaños inferior a 10nm de diámetro medio [5]. En física, para observar cosas desde escala micro a nano mediante distintos microscopios. En informática, de los ordenadores de tamaño normal a los portátiles de tamaño reducido. En ciencias biológicas, para observar en profundidad el comportamiento del núcleo de las células y estudiar biomoléculas únicas y complejas a nivel nanométrico. En la industria alimentaria, los nanomateriales se han explorado para aumentar de forma drástica la producción, el envasado, la vida útil, así como la biodisponibilidad de nutrientes. Además, también se han utilizado como sensores alimentarios para detectar la calidad y seguridad de alimentos y para construir novedosos sistemas de almacenamiento de hidrógeno capaces de suministrar energía limpia a países que aún dependen de combustibles contaminantes tradicionales y no renovables [6].

La aplicación de la nanotecnología en la investigación de las ciencias de la vida, sobre todo a nivel celular para la atención sanitaria, se conoce como nanomedicina y, en tan solo unas décadas ha adquirido una importancia fundamental en aplicaciones industriales y médicas. Las aplicaciones médicas potenciales se centran fundamentalmente en la detección, el diagnóstico, la monitorización y la terapia de enfermedades. La existencia

de prótesis mejores y más duraderas, y de nuevos sistemas de administración de fármacos son de gran interés científico y constituyen un punto de partida para la mejora de los tratamientos permitiendo terapias menos invasivas para cardiopatías, diabetes y otras enfermedades [7].

Existen diferentes nanoestructuras con aplicación en el ámbito de la biomedicina como pueden ser nanopartículas, nanocristales, liposomas o nanomateriales de carbono, entre otras (Figura 2). En la siguiente sección se desarrollarán ampliamente algunos de los tipos de nanopartículas existentes al ser estas el objeto de la presente tesis.



**Figura 2.** Representación de algunos tipos de nanoestructuras.

## *2. Tipos de Nanopartículas*

Las nanopartículas se pueden clasificar según diferentes criterios en función de sus características. Sin embargo, para nuestros propósitos, se van a dividir en dos categorías: blandas y duras [8]. Las nanopartículas blandas basan su composición en materiales orgánicos, normalmente preparados a partir de polímeros o moléculas de monómeros capaces de autoensamblarse en grandes partículas. Los materiales que las componen pueden ser tanto polímeros sintéticos, como el polietilenglicol (PEG) o el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) [9], como materiales de origen natural, como la seda

[10] o la celulosa [11]. Por su parte, las nanopartículas duras presentan carácter inorgánico y normalmente no son biodegradables. Pueden estar formadas por compuestos como la plata [12] o el oro [13].

A pesar de que ambos tipos de nanopartículas han demostrado lograr buenos resultados en numerosos estudios de investigación, han sido las nanopartículas blandas u orgánicas las que han presentado numerosas ventajas como nanovehículos de fármacos, debido a características tales como su biodegradabilidad, no antigenicidad y biocompatibilidad [14].

### *2.1. Nanopartículas orgánicas*

En la actualidad, se están desarrollando numerosos estudios científicos enfocados hacia la integración de polímeros naturales o sintéticos en distintos dispositivos y materiales médicos, tales como implantes, sistemas de liberación de medicamentos, “scaffolds” e injertos [15]. La posible preferencia por los biopolímeros, radica en que sus propiedades están adaptadas a las exigencias particulares de los seres vivos y se asemejan a la matriz extracelular presente en las células del cuerpo humano [16]. Además, su biocompatibilidad y su baja inmunogenicidad las convierte en un sistema aún más atractivo para la administración de fármacos.

Las nanopartículas poliméricas también pueden convertirse en sistemas de liberación de fármacos mediante diversos métodos. Estos métodos incluyen, la coprecipitación, que consiste en combinar el fármaco durante la producción de las nanopartículas, lo que permitiría la carga simultánea, y favorecer la adsorción del fármaco que implica el contacto e incubación de soluciones concentradas de fármacos con las nanopartículas sintetizadas previamente [17]. La carga de fármaco depende de la solubilidad de éste, el tamaño de las nanopartículas, el medio y los polímeros empleados.

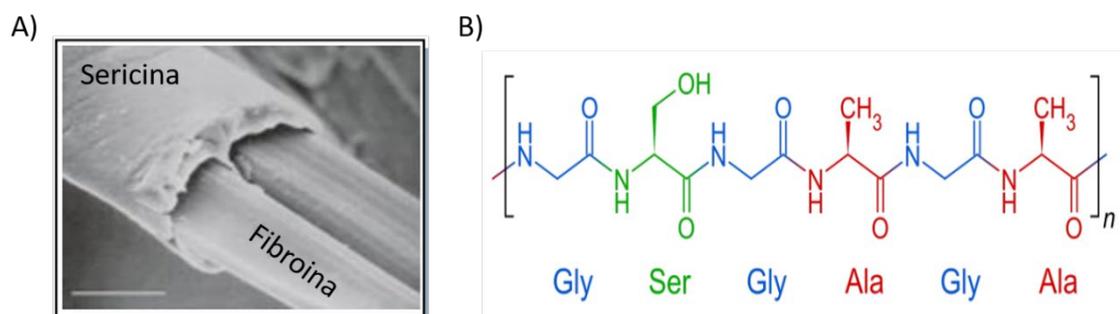
Algunos de los ejemplos más comunes de polímeros naturales utilizados en los ámbitos biomédico y farmacéutico son la fibroína de seda, el alginato, el quitosano, la gelatina, el colágeno, la elastina, el almidón y la celulosa [18]. Las nanopartículas de fibroína de seda, celulosa y quitosano serán descritas con mayor detalle en los siguientes apartados al

tratarse de las nanopartículas que se han sintetizado y caracterizado en la presente tesis doctoral.

### 2.1.1. Nanopartículas de fibroína de seda

La seda es un polímero natural producido por algunos insectos, entre ellos, el gusano de seda *Bombyx mori*. Se trata de un material suave, resistente, flexible y brillante, con gran valor comercial por lo que ha sido utilizado desde hace miles de años como material para la confección de ropa y diversos objetos ornamentales. Es uno de los materiales más apreciados y preciosos del mundo, por lo que se ha convertido en uno de los principales productos de exportación de muchos países [19].

La seda está formada por un hilo polimérico alargado, cuya estructura química consta de una secuencia de aminoácidos que se repiten a lo largo de la cadena. Estos aminoácidos se unen entre sí mediante enlaces peptídicos, formando pequeñas unidades llamadas proteínas que, a su vez, se entrelazan entre sí formando una estructura única conocida como seda [20]. Está compuesta principalmente por dos proteínas: fibroína y sericina (Figura 3A). La fibroína de seda (SF) representa entre un 72% y un 81% del total frente al 19-28% de sericina. La sericina es una glicoproteína hidrofílica compuesta principalmente por serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico. Por su parte, la fibroína (Figura 3B) es una proteína heterodimérica constituida principalmente por glicina, alanina y serina que se unen para formar una cadena lineal ácida que se enrolla y se une entre sí misma para formar una estructura tridimensional. Además, está formada por tres subunidades: una cadena pesada, una cadena ligera y la glicoproteína P25 manteniendo una relación molar 6:6:1. La cadena pesada de 325kDa confiere a la seda las propiedades fisicoquímicas más notables debido al pliegue de sus dominios cristalinos en láminas  $\beta$  antiparalelas [21], estructura extremadamente resistente a la descomposición, lo que la hace ideal para su uso como biomaterial.



**Figura 3. A)** componentes de la fibroína de seda vistos bajo un microscopio electrónico [22].

**B)** estructura primaria de la fibroína de seda [23].

Durante las últimas décadas, el uso de la seda como biopolímero para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas ha crecido considerablemente debido a sus propiedades únicas, como su resistencia a la descomposición, su ligereza y su elasticidad [24]. Se ha utilizado, por ejemplo, para fabricar suturas quirúrgicas, dispositivos para liberar fármacos y se está investigando su uso como material para la fabricación de implantes médicos, como prótesis para la reconstrucción de tejidos dañados [25].

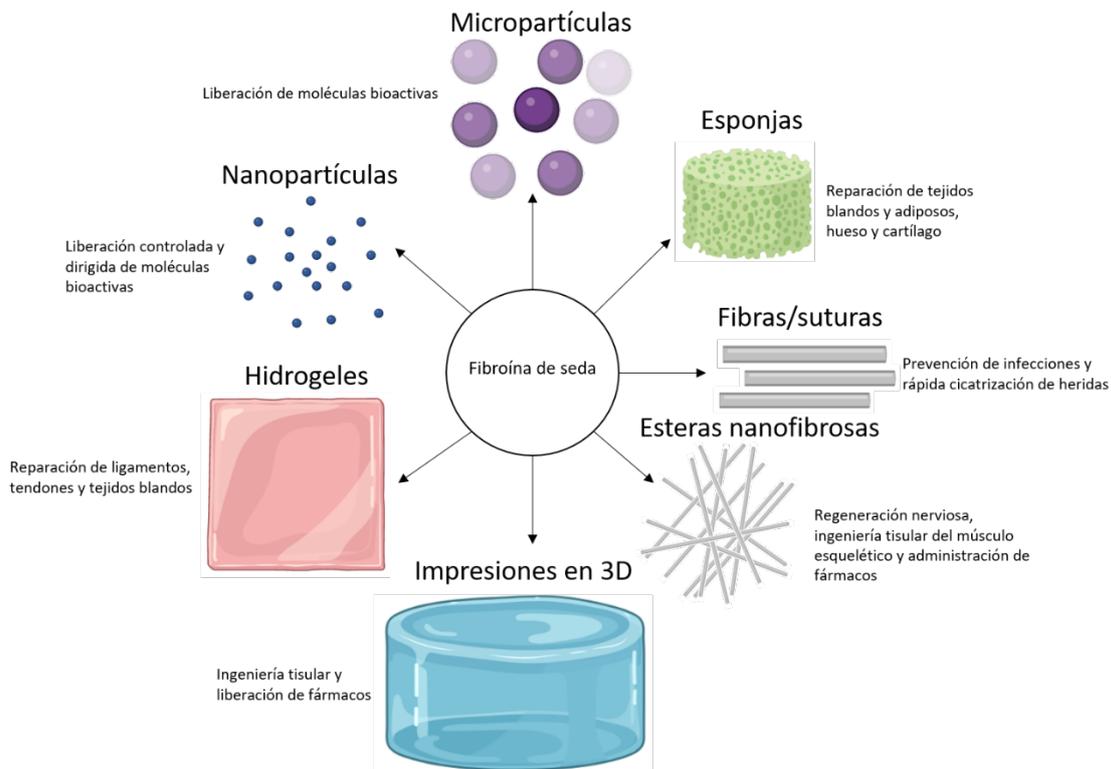
No obstante, se ha comprobado que puede presentar problemas de biocompatibilidad e hipersensibilidad debidos principalmente a la presencia de la sericina [26]. Por ello, estas proteínas se separan mediante un proceso conocido como desgomado, basado principalmente en sus distintas hidrofobicidades. Existen diferentes métodos estandarizados de desgomado, pero el más usado es el que utiliza una ebullición alcalina en un baño con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Este método también se puede complementar mediante el uso de ultrasonidos o autoclave. Estudios presentes en la bibliografía han demostrado que el proceso de desgomado utilizado influye en las propiedades de la SF obtenida [27].

Recientes avances en el campo de la biotecnología han permitido que la SF sea un material muy útil en medicina ya que presenta una excelente combinación de propiedades mecánicas y biológicas como su elevada resistencia a la tracción y a la rotura, elongación, rigidez y ductilidad y su gran biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad [28]. La SF ha sido sometida a distintos formatos de procesamiento para adaptarse a las necesidades requeridas (Figura 4), y de esta forma se han creado materiales compuestos que se utilizan para la fabricación de implantes, prótesis y otros dispositivos médicos, como los hidrogeles. Estos materiales presentan la ventaja de ser muy resistentes y duraderos, lo que les permite soportar la presión y el estrés a los que se exponen en el cuerpo humano [29]. A diferencia de otros polímeros biodegradables como el ácido

poliláctico (PLA), PLGA o el colágeno, la SF muestra una menor respuesta inmunogénica además de una excelente biocompatibilidad, convirtiéndola en un material muy adecuado para la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos.

Para el propósito de la presente tesis doctoral es importante destacar el uso de las nanopartículas de fibroína de seda, “Silk fibroin nanoparticles” (SFNs), en la industria farmacéutica como portadoras de fármacos, debido a la combinación única de propiedades mecánicas y biológicas mencionadas anteriormente.

Son muchos los métodos que se han descrito en la bibliografía para sintetizar nanopartículas de fibroína de seda, tales como la desolvatación, el uso de fluidos supercríticos y de campos eléctricos, la precipitación salina, o macroemulsiones [14]. En particular, para la presente tesis se empleó la desolvatación en un disolvente orgánico a partir de una disolución de fibroína de seda utilizando el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIMAc) como disolvente. La particularidad de los líquidos iónicos reside en su capacidad para actuar como disolventes versátiles en diversas aplicaciones químicas y de ingeniería. Su naturaleza modulable permite ajustar sus propiedades físicas y químicas según las necesidades específicas de cada proceso. Además, su baja toxicidad y su menor impacto ambiental los convierten en una opción prometedora para promover la sostenibilidad y la seguridad en la industria química [10].

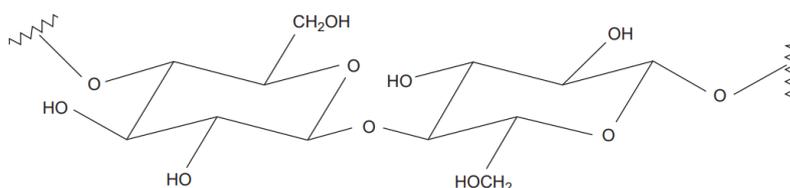


**Figura 4.** Formas y aplicaciones biomédicas de la fibroína de seda.

Las SFNs tienen, además, aplicaciones potenciales en medicina debido a su capacidad para absorber, transportar y liberar una amplia gama de moléculas bioactivas. Para el tratamiento contra el cáncer, concretamente, se han utilizado SFNs cargadas con diferentes fármacos quimioterapéuticos, entre los que se encuentran el cisplatino [30], la doxorubicina [31], el paclitaxel [32], el 5-Fluorouracil [33], un nucleótido uracilo análogo que se ha utilizado en el tratamiento de diversas neoplasias humanas, como los cánceres de estómago, colon, recto y mama, y la gemcitabina [34] un fármaco anticancerígeno aprobado por la “Food and Drug Administration” FDA, que tiene un alto potencial en supresión de diferentes carcinomas como el de páncreas, vejiga y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). Además, se han hecho estudios de unión simultánea de más de un fármaco, tales como paclitaxel y doxorubicina, logrando así una mejor acción terapéutica [35]. También se han unido otros agentes quimioterapéuticos pero de origen natural (derivados de plantas), mejorando su biodisponibilidad, como la curcumina [36] y la quercetina [37], o la naringenina [38] y el ácido rosmarínico [39].

### 2.1.2. Nanopartículas de celulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante en la Tierra. Se trata de un polímero lineal compuesto por unidades repetitivas de dos anillos de anhidroglucosa conectados mediante un enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico. Las cadenas de celulosa se ensamblan mediante enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y fuerzas de Van der Waals entre grupos hidroxilo y oxígenos adyacentes para formar fibrillas de hasta varios micrómetros de longitud confiriendo una estructura tridimensional microcristalina (Figura 5).



**Figura 5.** Unidad estructural de la celulosa [40].

Estas características hacen que sea un material con alta cristalinidad, alta superficie específica, propiedades reológicas adecuadas, biocompatibilidad, baja citotoxicidad, propiedades mecánicas sobresalientes, resistente al calor y a la luz (estabilidad química) y además, es biodegradable en comparación a otros y por lo tanto muy útil para una gran variedad de aplicaciones [41].

En los últimos años son muchos los trabajos de investigación que se han basado en este polímero como agente estabilizante [42], aditivo para alimentos [43], material para el recubrimiento de superficies [40], agente no tóxico [44], biopolímero de liberación controlada [45] y agentes antimicrobianos [46], entre otras. Más concretamente, los nanomateriales basados en celulosa se están utilizando ampliamente para aplicaciones biomédicas [47], tales como implantes médicos, en ingeniería de tejidos [48], cicatrización de heridas [49], como transportadores de fármacos de curcumina [50] con efectos quimioterapéuticos, para el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* Thomas et al. [51] prepararon una formulación de nanocristales híbridos de alginato y celulosa. La formulación resultante tenía una mayor eficacia de encapsulación, además de ser útil para la administración oral controlada del fármaco rifampicina.

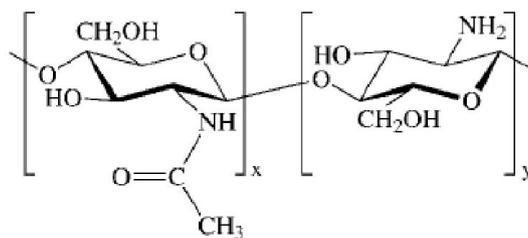
De entre estos nanomateriales, las nanopartículas de celulosa han aumentado su popularidad recientemente en los estudios de investigación debido a sus prometedoras propiedades anteriormente mencionadas. En lo que se refiere a la obtención de estas nanopartículas son muchos los estudios que utilizan disolventes orgánicos convencionales como son N-dimetilacetamida/cloruro de litio (DMAC/LiCl) [52], 1,3-dimetil-2-imidazolidinona/cloruro de litio (DMI/LiCl) [53] y N-óxido de N-metilmorfolina (NMMO) [54]. Al preparar estas nanopartículas, la cantidad de subproductos que se generan e inestabilidad de estos procesos hacen que dichos procedimientos sean poco seguros y poco eficientes, por lo que surge la necesidad de utilizar disolventes menos dañinos. Los líquidos iónicos, como se ha comentado en el apartado anterior, además de poseer propiedades modulables, son muy buenos disolventes para compuestos muy diversos desde orgánicos polares, no polares, compuestos inorgánicos o poliméricos. Lee et al. [43] estudiaron las capacidades de diferentes líquidos iónicos para disolver biopolímeros y emplearon el EMIMAc, como uno de los líquidos iónicos aptos para disolver celulosa, sustituyendo así las técnicas que usan disolventes orgánicos convencionales y Al Hakkak et al. [55] obtuvieron nanopartículas

de celulosa esféricas utilizando EMIMAc, con diámetros entre 100 y 400 nm y con una elevada uniformidad.

Actualmente, existen algunos estudios relacionados con nanopartículas de celulosa como sistemas de liberación de fármacos. Entre ellos, cabe destacar el trabajo realizado por Putro et al. [56] que estudiaron el efecto de los tensioactivos naturales Triton X-100 y saponina, en nanopartículas de celulosa y almidón a través de la carga y liberación de fármacos hidrófobos y Ching et al. [57] que mejoraron la biodisponibilidad de la curcumina mediante nanopartículas de celulosa con curcumina y tensioactivos no iónicos incorporados. Estos estudios representan un importante paso adelante en el campo de la farmacia para las nanopartículas de celulosa.

### *2.1.3. Nanopartículas de quitosano*

El quitosano está compuesto por unidades monoméricas de 2-acetilamina-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil glucosamina) y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (glucosamina) unidas por enlace glucosídico  $\beta(1\rightarrow4)$  [58] (Figura 6). Se trata de un biopolímero derivado del polisacárido quitina y se obtiene tras la desacetilación de la quitina mediante la hidrólisis del monómero N-acetilglucosamina. La quitina es un polisacárido natural sintetizado por numerosos organismos vivos [59] que se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos o en las paredes celulares de hongos y levaduras. El gran interés en este polímero deriva especialmente de la gran cantidad de grupos funcionales que posee su estructura y de su excelente capacidad en la formación de capas de recubrimiento en las nanopartículas. En las propiedades más destacables del quitosano se encuentran las siguientes: su solubilidad, que depende de la cantidad de grupos amino libres, la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y el efecto antimicrobiano. Estas propiedades han generado un notable interés para el uso del quitosano con fines biomédicos [60].



**Figura 6.** Estructura del quitosano [61].

Debido a la variedad de propiedades fisicoquímicas y biológicas que se han mencionado previamente, el quitosano es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones. Por ejemplo, es considerado uno de los biopolímeros más prometedores para utilizar en el proceso de coagulación y floculación de partículas coloidales en el tratamiento de aguas residuales [62]. En el sector agrícola, se utiliza como aditivo y recubriendo frutas, verduras y flores para ayudar a la conservación de alimentos, retardando el crecimiento de microorganismos [63]. Además, en la industria médica se utiliza para fabricar vendajes antibacterianos que retienen mejor el agua que los vendajes convencionales [64].

En nanotecnología una de las aplicaciones del quitosano más estudiada en los últimos años se encuentra relacionada con la síntesis de nanocompuestos quitosano/metal. A la hora de preparar nanocompuestos metálicos, el quitosano puede ser usado como agente de recubrimiento, matriz polimérica y controlador del crecimiento de nanopartículas [65].

Para la síntesis de nanopartículas de oro y quitosano, en particular, se emplea comúnmente el ion  $\text{AuCl}_4^-$ , el cual presenta un comportamiento distinto según el pH de la solución. En ambientes acuosos, este ion de color púrpura se hidroliza mediante un equilibrio que intercambia iones  $\text{Cl}^-$  por  $\text{OH}^-$  [66]. El quitosano, por su parte, reduce el  $\text{Au(III)}$  a  $\text{Au(0)}$  a través del extremo  $\text{CH}_2\text{OH}$  de su estructura, siendo su capacidad reductora determinada por la reactividad del grupo hidroxilo unido al carbono 6 de la cadena principal [67]. Pestov et al. [68] proponen un mecanismo de reducción en tres etapas: la primera consiste en la complejación del ion  $\text{Au(III)}$  con el quitosano y lleva a la disociación de  $\text{AuCl}_4^-$ ; la segunda etapa, catalizada por el ion  $\text{Au(III)}$  complejado al quitosano, corresponde a la hidrólisis del quitosano y se evidencia por una disminución rápida de la viscosidad; la tercera etapa da lugar a la reducción del oro de forma rápida una vez que se acumula suficiente quitosano hidrolizado. Además, los disolventes ácidos son ampliamente utilizados en la síntesis de nanopartículas de oro y quitosano debido a que mejoran la solubilidad del quitosano y pueden participar en el mecanismo de

reducción del Au(III). La naturaleza del ácido utilizado, por ejemplo, el ácido acético, puede afectar la interacción electrostática entre el ácido y el quitosano, lo que a su vez puede ajustar la tasa de reducción del Au(III) y modificar la morfología de las nanopartículas metálicas resultantes. Estos parámetros son estudiados y analizados en el capítulo 5 de esta Tesis doctoral.

Debido a sus propiedades únicas, las nanopartículas de oro y quitosano han sido objeto de atención en la investigación biomédica como agentes antibacterianos. Katas et al. [69] sintetizaron nanopartículas de oro con extracto de *Lignosus rhinocerotis* y quitosano como agentes reductores y estabilizantes que mostraban una eficaz actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus sp.*). Por su parte, Hussein et al. [70] presentaron un nuevo método para potenciar las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de oro y quitosano frente a bacterias resistentes a antibióticos mediante la incorporación de extracto de *Punica granatum L.* en el recubrimiento de la nanopartícula.

### *3. Ventajas del uso de nanoestructuras para la distribución de fármacos*

En la actualidad, la humanidad se enfrenta a dos grandes desafíos en lo que a salud pública se refiere: el cáncer y la resistencia a los antibióticos. Ambos son problemas muy complejos y multifactoriales que han sido objeto de estudio y preocupación por parte de la comunidad científica durante décadas.

En el caso del cáncer, se trata, a grandes rasgos, de una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal de las células en el cuerpo. Existen muchos tipos diferentes de cánceres, casi tantos como tipos de células tiene el cuerpo, por lo que cada uno de ellos presenta unas características propias y desafíos de tratamiento. Aunque ha habido avances en la investigación y tratamiento del cáncer, esta enfermedad sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo ya que los tratamientos actuales de cirugía, radioterapia y quimioterapia siguen sin ser del todo efectivos [71][72].

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, se trata de un fenómeno en el que las bacterias desarrollan la capacidad de persistir ante los efectos de los antibióticos. Esto significa que las infecciones bacterianas que antes eran tratables con antibióticos ahora pueden volverse mucho más difíciles (o incluso imposibles) de tratar. La resistencia a los

antibióticos es un problema que ha surgido en gran parte debido al uso excesivo e inapropiado de antibióticos, tanto en humanos como en animales [73].

Para ambas afecciones, las nanopartículas han aportado ventajas frente al uso de fármacos convencionales, ya que gracias a ellas se pueden modificar parámetros del fármaco tales como la solubilidad, la difusividad, la vida media en el torrente sanguíneo, la toxicidad, la farmacocinética y la biodistribución. En esta sección se desarrollarán las posibles ventajas de cada uno de estos puntos.

### *3.1. Transporte de fármacos insolubles*

Las nanopartículas tienen la capacidad de transportar sustancias hidrofóbicas, lo que les permite dispersar fármacos insolubles en soluciones acuosas y mejorar así su biodisponibilidad. Esto es especialmente relevante porque muchos medicamentos abandonados debido a su baja solubilidad podrían considerarse útiles clínicamente al ser encapsulados en nanopartículas [74]. Se estima que el 90% de los fármacos en vías de desarrollo son insolubles en agua, mientras que tan solo el 40% de los fármacos en el mercado son insolubles [75].

Algunos ejemplos de nanopartículas como transportadores de fármacos insolubles se detallan a continuación. Bhardwaj et al. [76] sintetizaron nanopartículas de PLGA cargadas con el fármaco paclitaxel estabilizadas con tensioactivos catiónicos para aumentar la biodisponibilidad oral del fármaco en el tratamiento del cáncer de mama en ratas. Shenoy et al. [77] prepararon nanopartículas de policaprolactona (PCL) modificadas con óxido de polietileno cargadas con tamoxifeno, y los resultados mostraron que el nivel de acumulación del fármaco en el tumor aumentaba con el tiempo. Huang et al. [78] probaron una lente de contacto compuesta por quitosano, nanopartículas de plata y óxido de grafeno. Los autores indicaron su uso terapéutico como vehículo de administración de fármacos para el tratamiento de la queratitis fúngica, una enfermedad ocular grave en los países en desarrollo que a menudo conduce a la ceguera y la morbilidad ocular. Lee et al. [79] por su parte, desarrollaron un método para cargar dos fármacos, tetraciclina y lovastatina, en PLGA/nanopartículas de quitosano (tamaño medio, 107,8 nm) para luchar contra la infección bacteriana al mismo tiempo que se

minimiza la pérdida de material óseo. Los estudios preliminares realizados en perros para determinar la capacidad antibacteriana y de formación/regeneración ósea mostraron resultados prometedores contra los patógenos *A. actinomycetemcomitans* y *P. nigrescens*.

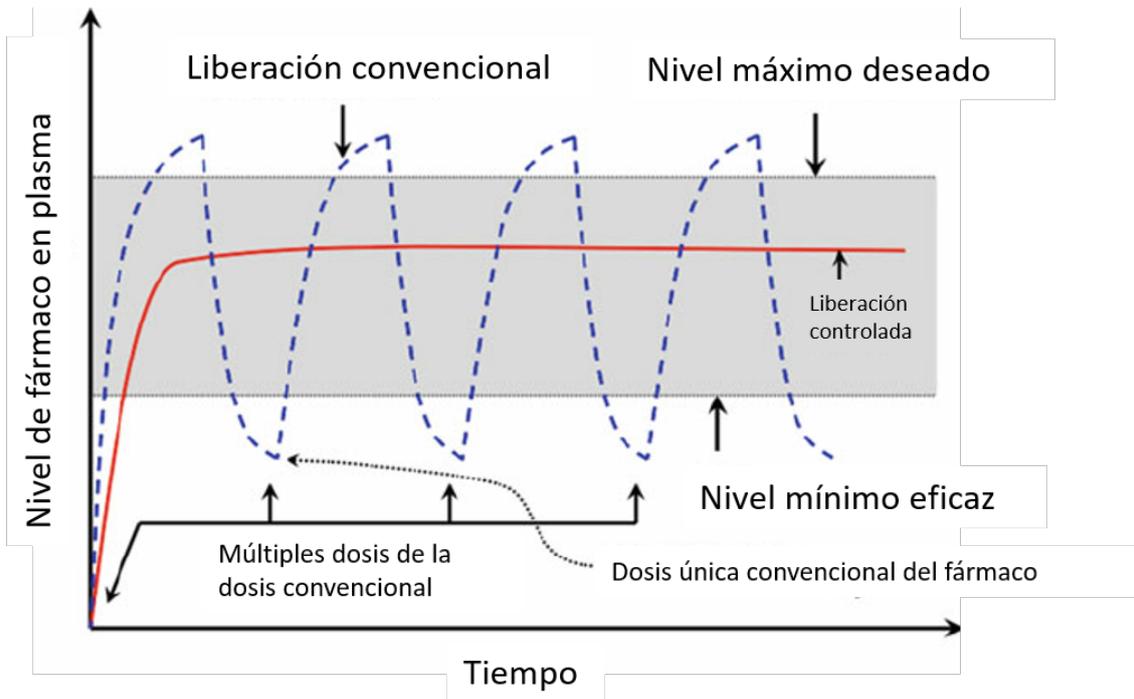
El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral ha conseguido encapsular fármacos hidrofóbicos en nanopartículas de fibroína de seda tales como: quercetina [37], curcumina [36], naringenina [38], ácido rosmarínico [39] e ibrutinib [80].

### 3.2. *Liberación controlada y/o sostenida*

La disponibilidad de fármaco activo y su concentración específica en el lugar de acción son factores determinantes en la eficacia terapéutica en cualquier tratamiento farmacológico [81].

Tras entrar en el organismo, la eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS) [82] o la filtración por el hígado y el bazo se produce muy rápidamente y secuestran a la mayoría de las nanopartículas. Este suceso ocurre porque tan pronto como las nanopartículas entran en el torrente sanguíneo, tienden a agregar y ser opsonizadas por macrófagos. La opsonización consiste en la unión de proteínas a la superficie de la nanopartícula como una “etiqueta” para que sean reconocidas por el sistema inmunitario y posteriormente eliminadas [83]. Debido a que esta eliminación se produce de manera rápida e inespecífica por el sistema inmunitario, se ve reducido el tiempo de vida de la nanopartícula en el torrente sanguíneo y, por tanto, su biodisponibilidad.

En la práctica, los fármacos convencionales requieren múltiples dosis que generan picos de concentración en la sangre, lo que provoca fluctuaciones en los niveles de concentración a lo largo del tiempo. La liberación prolongada o controlada persigue evitar esto, logrando una concentración constante de fármaco en la sangre durante un período largo de tiempo (Figura 7). Esto ha demostrado presentar grandes beneficios en los tratamientos con fármacos.



**Figura 7.** Liberación controlada de fármaco frente a la administración convencional en múltiples dosis [84].

El tiempo de retención se puede alterar funcionalizando la superficie de las nanopartículas con PEG [85], carbohidratos, grupos acetilo u otros elementos proteicos (péptido arginina-glicina-aspartato, RGD, albúmina) [86]. No obstante, cabe mencionar que estas modificaciones de la superficie también pueden alterar la capacidad de reconocimiento y, por tanto, la internalización de las nanopartículas por parte de las células. Por estas razones, al diseñar nanopartículas terapéuticas hay que tener muy en cuenta su capacidad de eliminación por parte del sistema inmune y su biodistribución.

### 3.3. Liberación dirigida

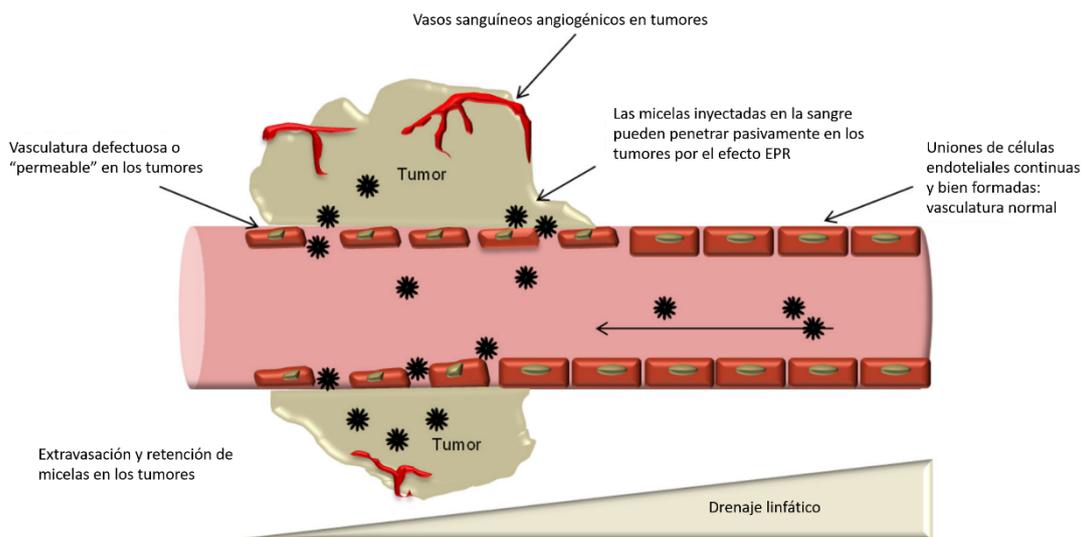
El diseño de nanopartículas se centra en controlar el tamaño de la partícula, la superficie y sus características físicas y químicas, con el objetivo de asegurar que transporten la cantidad necesaria de fármaco y lograr una acción específica en la zona afectada [87].

Sin embargo, los portadores de fármacos convencionales no son específicos y pueden dañar tejidos sanos, lo que limita su eficacia y aumenta los efectos secundarios [88]. Por

tanto, se han estudiado nuevas técnicas que permiten la modificación de la superficie de las nanopartículas mediante determinadas proteínas o sustancias que actúan como ligando. Además, el recubrimiento de las nanopartículas también puede evitar la aglomeración cuando entran en contacto con medios celulares o fluidos biológicos [89]. Este enfoque permite aumentar la concentración del fármaco en células o tejidos específicos, reducir las dosis y mejorar la eficacia y/o la tolerabilidad del tratamiento en sistemas biológicos.

En el campo del cáncer, esta estrategia ha sido ampliamente utilizada debido a las limitaciones de la quimioterapia convencional, como baja solubilidad del fármaco administrado, lo que dificulta su acción; alta toxicidad dependiente de la dosis; falta de especificidad tumoral (efectos secundarios) y resistencia a múltiples fármacos [90].

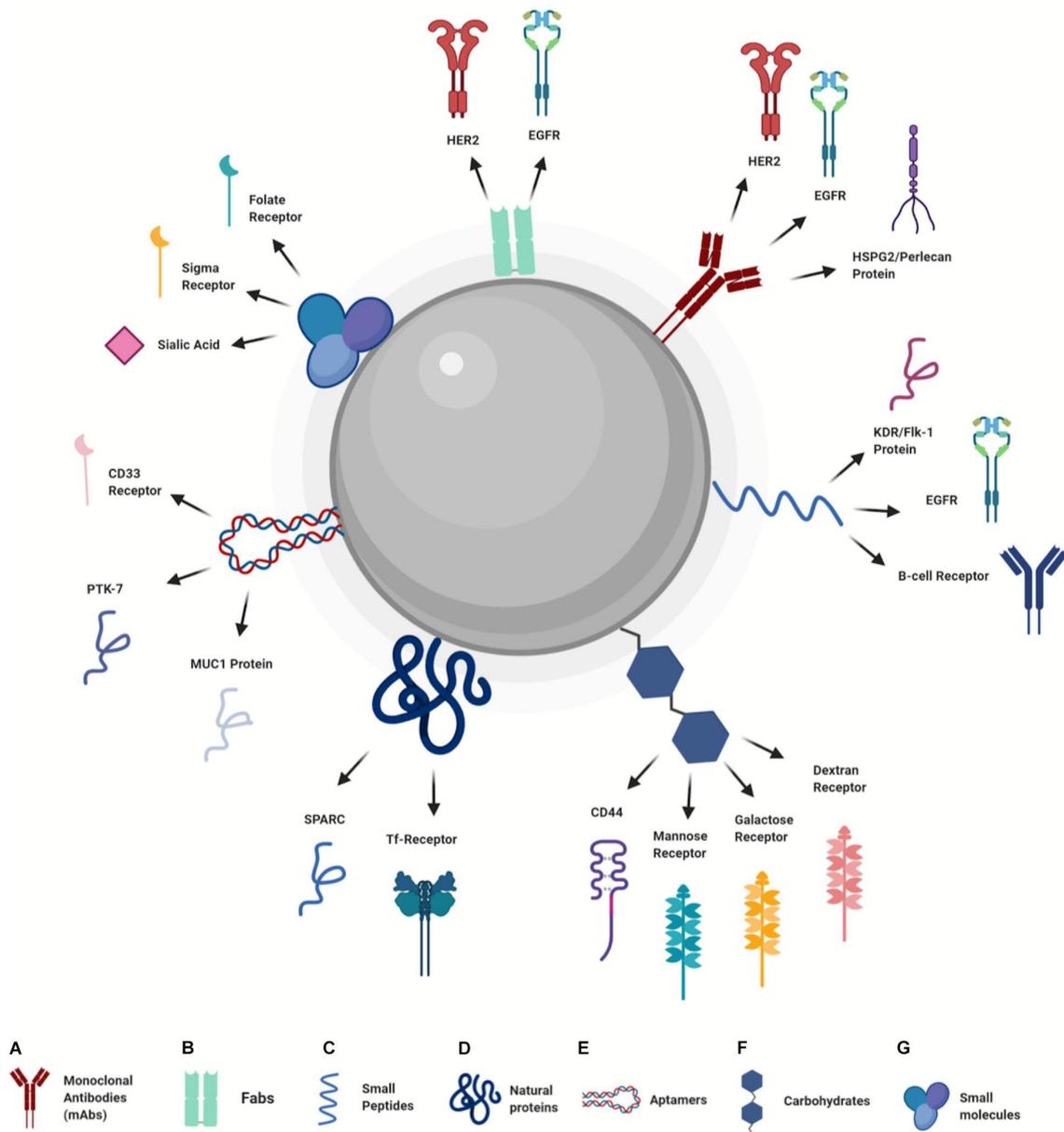
Para administrar fármacos antitumorales se pueden seguir dos estrategias: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo [91]. El direccionamiento pasivo se basa en la acumulación del agente terapéutico en los tumores haciendo uso de sus características distintivas con los tejidos normales. En las zonas tumorales, los vasos sanguíneos se caracterizan por ser altamente permeables, lo que contribuye a que las nanopartículas puedan acumularse eficazmente en dichas zonas [92]. Además, son más numerosos y voluminosos que en los tejidos sanos, lo que facilita la llegada de nanopartículas y su acumulación durante más tiempo en la zona afectada. Estos fenómenos se conocen como efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) (Figura 8) [93].



**Figura 8.** Efecto EPR y transporte pasivo [94].

Sin embargo, durante el direccionamiento pasivo, las nanopartículas encuentran varios obstáculos, como las barreras mucosas o la captación no específica de partículas en el camino hacia su objetivo, lo que limita su eficacia. Por el contrario, el direccionamiento activo utiliza ligandos específicos en la superficie de las nanopartículas que se unen a receptores o transportadores basados en estímulos [95] para lograr un reconocimiento selectivo de las células objetivo, lo que ha demostrado ser prometedor. Entre los distintos ligandos (Figura 9) estudiados se encuentran anticuerpos monoclonales (mAbs), aptámeros [96] (ácidos nucleicos de cadena sencilla), péptidos y proteínas, y moléculas pequeñas como el ácido fólico (FA) [97] o el hialurónico [98]. Estos ligandos son elegidos porque sus receptores diana se encuentran sobreexpresados en las células tumorales.

Por ejemplo, Fathian kolahkaj et al. [99] informaron de una captación muy eficiente de nanopartículas de PLGA modificadas con un mAb anti-HER2. La evaluación de la captación en células HER2 positivas (MDA-MB-453) y negativas (MCF-7 y BT-20) demostró mayores niveles de internalización en una línea celular HER2 positiva, en comparación con las negativas. Además, Scheeren et al. [100] utilizaron transferrina (Tf) para funcionalizar la superficie de nanopartículas de PLGA cargadas con doxorubicina. Se aprovechó la interacción entre la transferrina y los receptores de Tf (Tf-R), altamente expresados en las células cancerosas, para mejorar la captación y la liberación del fármaco. Los resultados mostraron que las nanopartículas Tf-PLGA@DOX reducían enormemente la viabilidad de las células epiteliales humanas de cáncer de cuello de útero HeLa (Tf-R positivas), en comparación con los queratinocitos inmortalizados HaCaT con baja expresión de Tf-R. Asimismo, Khan et al. [101] utilizaron FA para funcionalizar nanopartículas híbridas de quitosano-lípido con el fin de aumentar la captación a través de la interacción del FA con el receptor de folato (FR), altamente expresado en las células cancerosas. Los resultados mostraron una mayor captación de las nanopartículas conjugadas con FA en una línea celular de cáncer de ovario (SK-OV-3) en comparación con las nanopartículas desnudas.



**Figura 9.** Estrategias de funcionalización de la superficie de nanopartículas para lograr liberación dirigida del fármaco [102].

De esta manera, las nanopartículas decoradas o funcionalizadas con los ligandos encuentran su entrada a la célula de forma más rápida y directa que cuando no lo están, ya que cuanto mayor es la cantidad de sobreexpresión del receptor, mayor es la internalización celular de la nanopartícula. Estos conceptos son estudiados y analizados en el capítulo 3 de esta tesis doctoral.

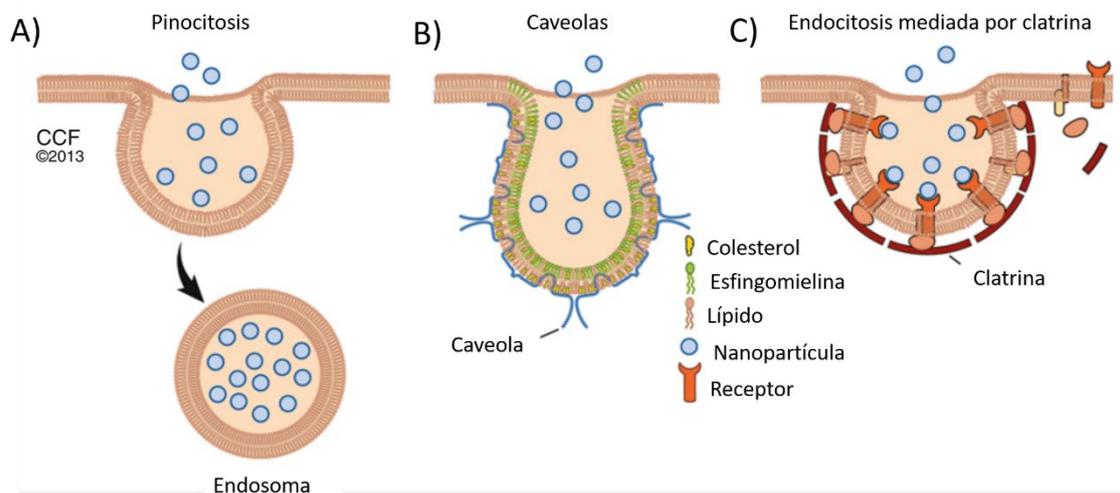
#### *4. Diseño de nanopartículas terapéuticas*

En el diseño de nanopartículas terapéuticas, es esencial comprender cuáles son las interacciones entre éstas y las células porque determinan la vía por la que se va a realizar la internalización de las nanopartículas, así como su clasificación intracelular en los diferentes compartimentos celulares y su retención en la zona diana, lo que influiría en la eficacia terapéutica [103].

Para determinadas aplicaciones puede ser más deseable que las nanopartículas interaccionen de manera más eficaz con las células (terapia génica [104]) y así poder internalizarse más fácilmente o puede ser necesario minimizar las interacciones con el objetivo de prolongar la circulación de la nanopartícula en sangre, por ejemplo, para que así dispongan de tiempo suficiente para entrar en los tejidos diana [105]. En cualquier caso, hay que comprender que la interacción nanopartícula-célula es un proceso dinámico y que depende de las características físicas de las propias nanopartículas, así como de las propiedades de la membrana celular [106]. El tamaño, la morfología o forma, la carga superficial y la presencia de ligandos en la superficie de la nanopartícula son características físicas de las nanopartículas a tener en cuenta. Del mismo modo, las propiedades de la membrana celular, como su fluidez, el tipo de receptores expresados en su superficie, así como, la densidad de receptores o la tasa de eliminación de los mismos pueden influir en las interacciones célula-nanopartícula [106].

La mayoría de las nanopartículas se internalizan en las células a través de las vías plasmadas en la Figura 10. En primer lugar, la pinocitosis (Figura 10A), que consiste en la internalización de fluido extracelular y su contenido por parte de las células, se subdivide en micro o macropinocitosis dependiendo del tamaño de la invaginación de la membrana celular que atraparé el fluido extracelular y, en este caso, la nanopartícula que se encuentra en él. Es importante destacar que la micropinocitosis se produce en casi todas las células, mientras que la macropinocitosis sólo se da en tipos celulares concretos tales como las células dendríticas inmaduras [107]. Esta vía de internalización tiene la particularidad de que se puede producir sin necesidad de una interacción directa de las nanopartículas con la membrana celular [108]. Debido al pequeño tamaño que presentan las invaginaciones de la membrana al captar las nanopartículas, esta vía es la predominante para la captación de partículas grandes y micropartículas. Otra de las vías de internalización de nanopartículas, ilustrada en la Figura 10C, es la endocitosis mediada

por clatrina (CME). Se trata de un mecanismo de captación celular que implica la formación de vesículas endocíticas recubiertas de una proteína denominada clatrina [109]. Este proceso de captación se inicia con la unión de un ligando a sus receptores en la membrana celular. La CME es el mecanismo que utilizan las células para internalizar las nanopartículas conjugadas con ligandos y puede utilizarse para dirigir las nanopartículas a células específicas [109]. Este mecanismo es utilizado, por ejemplo, por los macrófagos cuando internalizan las sustancias opsonizadas para su eliminación [110]. Por último, las caveolas (Figura 10B) son vesículas formadas por invaginaciones de la membrana celular de 50-100 nm de diámetro [111]. Las vesículas caveolares encierran predominantemente esfingolípidos, colesterol y caveolina (la proteína más predominante en las caveolas) y se unen para formar microdominios, que dictarán la carga que se transporta [112]. Estos microdominios, que pueden contener lípidos catiónicos como la esfingomiélin (cuyo dominio polar contiene un grupo amina), pueden interactuar y mediar en la endocitosis de nanopartículas aniónicas como las nanopartículas de oro pegiladas donde las nanopartículas son modificadas con PEG [113]. La endocitosis dependiente de caveolas es la vía predominante de captación de nanopartículas en células endoteliales y musculares.



**Figura 10.** Vías de internalización de nanopartículas más comunes en células. **A)** pinocitosis, **B)** caveolas y **C)** endocitosis mediada por clatrina [114].

Cabe destacar también el papel fundamental de la exocitosis como mecanismo inverso de la endocitosis en el aumento de la acumulación de nanopartículas en las células. La disminución de la exocitosis evita la secreción de nanopartículas al espacio extracelular y, por lo tanto, mejora la eficacia terapéutica. Numerosos estudios de investigación

descubrieron que existía una correlación negativa entre el tamaño de las nanopartículas y el proceso de exocitosis, ya que las nanopartículas con tamaños relativamente grandes muestran una disminución de la exocitosis y una mayor retención intracelular [85].

#### *4.1. Tamaño y polidispersidad*

El tamaño y la polidispersidad de las nanopartículas son factores cruciales que influyen en la eficacia de la administración de fármacos en muchos aspectos, como la circulación, la biodistribución, la acumulación y la penetración en los sitios diana, así como la captación por parte de la célula y la distribución subcelular [115].

La biodistribución por el torrente sanguíneo se ve influida por el tamaño de las nanopartículas terapéuticas debido a los diferentes tamaños de exclusión de los órganos. Así, el tamaño de corte de la filtración renal es de 5,5 nm [116] y el de las fenestraciones o poros transcelulares vasculares del hígado es de 50-300 nm [74]. Por ello, las partículas inferiores a 5,5 nm se excretan más fácilmente a través de la orina [116], los tamaños inferiores a 50 nm podrían penetrar fácilmente en el endotelio y quedar atrapados en el hígado, mientras que las partículas de más de 200nm pueden ser eliminadas por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial (RES) [117].

En las zonas tumorales, en concreto, el efecto EPR facilita la llegada de nanopartículas con tamaños adecuados y su acumulación durante más tiempo en la zona afectada. No obstante, para asegurar la entrada de las nanopartículas al tejido tumoral se debe tener en cuenta que el tamaño de corte de los poros de los vasos tumorales oscila entre 200 nm y 1,2  $\mu\text{m}$ , dependiendo del tipo de tumor [92]. Numerosos estudios han demostrado que las nanopartículas terapéuticas con un tamaño de 20 a 200 nm presentan una mayor acumulación en tejidos tumorales debido a que no son reconocidas por el RES ni tampoco filtradas por el riñón[118][119].

Por lo general, tras entrar en la región tumoral, las nanopartículas de gran tamaño son capaces de quedar bien retenidas en los alrededores del tumor, pero resulta complicado penetrar profundamente en la densa matriz tumoral, mientras que las de pequeño tamaño pueden entrar fácilmente pero, son bombardeadas de vuelta al torrente sanguíneo por la elevada presión del líquido intersticial del tumor [120][121]. Aunque hay estudios que

intentan soslayar este problema modulando el microambiente tumoral, la optimización del tamaño de las nanopartículas se considera una solución crítica [122].

Una vez que las nanopartículas penetran en las zonas tumorales, su tamaño también influye en el siguiente proceso de captación celular, en el que las nanopartículas de diferentes tamaños presentan distintas tasas de internalización [123]. Las nanopartículas de aproximadamente 50 nm de diámetro suelen ser absorbidas más rápidamente por las células que las de mayor tamaño [124][125]. Esta captación preferente de las nanopartículas pequeñas se debe al tamaño de las fosas recubiertas de clatrina y las invaginaciones caveolares de la membrana celular (50-100 nm de diámetro) [114]. Por otro lado, las nanopartículas más pequeñas de 25 nm pueden ser demasiado pequeñas, por lo que se requiere un gran número de ellas para inducir la endocitosis mediada por caveolas o bien la pinocitosis.

Aunque la mayoría de los estudios de captación celular asumen que las células interactúan con nanopartículas individuales, algunas formulaciones de nanopartículas (en particular las que tienen una carga superficial positiva) agregan en presencia de proteínas, por lo que la agregación de nanopartículas es un factor importante a tener en cuenta al estudiar la captación celular [126]. El índice de polidispersidad (PDI) representa la amplitud de la distribución de tamaño de las nanopartículas y cuanto más bajo es su valor, es posible afirmar que la distribución de tamaño es más estrecha y, por tanto, las nanopartículas tienen un tamaño más similar unas a otras, lo que garantiza su mayor estabilidad en dispersión [127].

#### 4.2. *Morfología*

La forma de las nanopartículas también puede influir en su distribución, internalización e interacción con los componentes celulares. Por ejemplo, un estudio demostró que las nanopartículas en forma de disco presentaban una internalización más eficaz que las de forma de barra o bastón [128]. Mathaes et al. [129] realizaron una investigación detallada para comprender la variación de la captación celular de micropartículas y nanopartículas alargadas, no esféricas y esféricas basadas en PLGA. Las imágenes microscópicas fluorescentes indicaron que los macrófagos captaron  $1,23 \pm 0,520$  partículas esféricas de PLGA por célula. Sin embargo, las partículas alargadas tuvieron una incidencia

considerablemente reducida de captación celular ( $0,424 \pm 0,210$  partículas/célula), que se redujo aún más por la pegilación. Además, las nanopartículas de oro con forma de barra tienen una menor absorción celular que las esféricas [130]. Estas diferencias se explican por la cinética de la captación celular. La membrana celular tarda más en envolver las nanopartículas con forma de barra que las esféricas, y se necesitan más nanopartículas con forma de barra para inducir la endocitosis, a diferencia de las esféricas [131].

### 4.3. *Carga superficial*

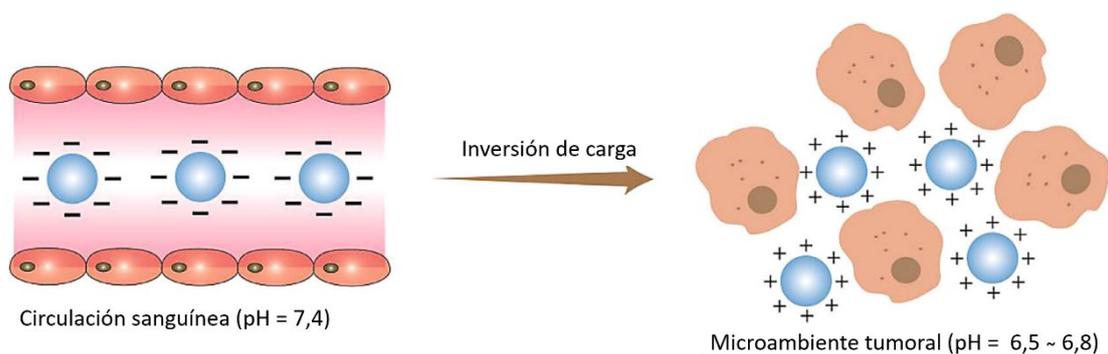
La carga superficial o potencial zeta de las nanopartículas terapéuticas desempeña un papel importante en la tasa de internalización y la distribución intracelular de fármacos [132].

La carga positiva de las nanopartículas terapéuticas les confiere la capacidad de ser fácilmente internalizadas por las células diana. Esto se debe a que la membrana celular, compuesta por fosfolípidos aniónicos y carbohidratos como el ácido siálico, presenta una carga negativa [133][134]. Las nanopartículas cargadas positivamente interactúan con la membrana celular y promueven su internalización a través del mecanismo de CME. Debido a esta interacción y a la rápida endocitosis que inducen, las nanopartículas catiónicas se utilizan como plataforma para la liberación de genes y otras aplicaciones que requieren una rápida internalización celular [135]. No obstante, esta interacción rápida también se puede dar en macrófagos de los MPS, lo que disminuiría el tiempo de vida de los nanoportadores de fármacos en circulación [136].

Las nanopartículas de carga neutra o negativa, por su parte, tienen un tiempo de vida útil en el torrente sanguíneo más largo, pero también presentan algunas limitaciones. Por ejemplo, la fuerza electrostática repulsiva entre estas nanopartículas y la membrana celular dificulta la liberación dirigida del fármaco a través de la membrana [128]. Aunque la internalización celular de las nanopartículas de carga neutra es limitada, son útiles en aplicaciones donde no se requieren interacciones específicas con las células. Una estrategia para neutralizar la carga de las nanopartículas es mediante la adición de grupos funcionales hidroxilo, que permiten contrarrestar la carga y mejorar la interacción con las células [137].

Xu et al. [138] estudiaron el efecto de la carga superficial sobre la internalización celular de macrófagos *in vitro* y la eliminación y biodistribución en sangre *in vivo* de las nanopartículas poliméricas cargadas con hemoglobina (HbPNPs). Estas HbPNPs con valores de potencial zeta de  $-19,5\text{Mv}$  se modularon con bromuro de cetiltrimetilamonio cationizado (CTAB) y dodecilsulfato sódico anionizado (SDS) obteniendo valores de  $+5,46\text{ mV}$  y  $-36,3\text{ mV}$ , respectivamente. Todas presentaban un tamaño de partícula pequeño, monodispersión, alta estabilidad y baja citotoxicidad. Se observó que las HbPNPs anionizadas se eliminaban rápidamente de la circulación sanguínea, mientras que aquellas cationizadas con valores bajos de potencial zeta absoluto ayudaban a prolongar su tiempo de circulación en sangre.

Sin embargo, existen materiales que permiten que podamos utilizar los beneficios tanto de las partículas positivas como negativas a la vez. Estos materiales se denominan materiales de inversión de carga y los más comúnmente utilizados son el carboximetil quitosano [139] y el poliuretano [140], entre otros. Presentan un punto isoeléctrico entre el pH del entorno fisiológico normal y el microentorno tumoral (pH 6,5-6,8) con lo que en condiciones fisiológicas normales, la carga de los portadores de fármacos compuestos por estos materiales es negativa, evitando tanto la opsonización como el efecto MPS hasta el sitio de acción o microambiente tumoral, que se caracteriza por su ligera acidez. Esta acidez, hace que se protonen, modificando así su carga superficial de negativa a positiva, permitiendo la interacción con la membrana tumoral cargada negativamente y promoviendo así la internalización del fármaco en la célula (Figura 9).



**Figura 11.** Representación esquemática del comportamiento de las partículas de inversión de carga *in vivo*. En el tejido fisiológico normal, la partícula cargada negativamente puede evitar la interacción con la opsonina y la eliminación por el MPS. En el entorno ligeramente ácido del tumor, la carga de la partícula invertida es positiva, lo que puede interactuar con la membrana celular cargada negativamente [136].

Hu et al. [141] sintetizaron nanopartículas con inversión de carga lo que no sólo aumentó eficazmente la tasa de captación de portadores de fármacos positivos por parte de las células tumorales, sino que también permitió una larga circulación *in vivo* en las condiciones originales (pH 7,4), ya que la carga superficial de la partícula era negativa.

En el proceso de inversión de la carga de la partícula, el cambio de carga a veces provoca algunos cambios en otras propiedades físicas de la partícula, como una reducción significativa del tamaño [142]. Por lo tanto, el efecto global de las propiedades físicas debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar los transportadores de fármacos.

## 5. *Nanofármacos aprobados por la FDA*

Desde 1995, son bastantes los nanofármacos que han sido aprobados por la FDA y se encuentran disponibles para su uso clínico [143]. Estos incluyen nanopartículas liposomales, poliméricas, micelares, inorgánicas, proteicas y nanocristales. La mayoría de ellos se administran por vía intravenosa u oral y son el resultado de la reformulación de combinaciones de fármacos quimioterapéuticos con nanopartículas orgánicas.

Concretamente, el primer nanofármaco para el tratamiento del cáncer fue una formulación liposomal PEGilada de doxorubicina (Doxil®, Caelyx). Doxil® se formula con liposomas estabilizados estéricamente compuestos de fosfolípidos, colesterol y PEG para prolongar el tiempo de circulación y evitar la eliminación por el RES. Su tamaño es inferior a 120 nm, por lo que aprovecha las ventajas del efecto EPR para acumularse en el tumor y disminuir la cardiotoxicidad [144]. Otro ejemplo sería la reformulación del fármaco rapamicina con nanopartículas micelares (Rapamune®) que presentan menores efectos secundarios y mejores índices terapéuticos que sus homólogos convencionales [145].

Además, dos nanopartículas proteicas han sido aprobadas hasta la fecha como nanofármaco [146]. Una es Abraxane® (Celgene), que consiste en una nanopartícula de paclitaxel estabilizada con albúmina para tratar el cáncer de mama, cáncer de pulmón y de páncreas. La ventaja que presenta es que se administra directamente al tumor debido a su mayor solubilidad en medio acuoso. El segundo es Ontak® (Eisai), una nanopartícula de denileucina diftotox (proteína que combina L-2 y toxina diftérica) que se utiliza para

tratar el linfoma cutáneo de células T. La ventaja de Ontak® es su mejor solubilidad y administración selectiva en el tumor, así como su especificidad a células T diana [147].

Además, existen dos nanoportadores de antibióticos aprobados por la FDA [148]. En primer lugar, AmBisome® que se trata de una preparación liposomal de anfotericina B utilizada para tratar infecciones graves causadas por hongos, especialmente aquellos que afectan a órganos internos. El nanocomposite ayuda a reducir la toxicidad renal y mejorar la tolerabilidad del fármaco y, en segundo lugar, Arikayce® que es una suspensión inhalatoria liposomal del fármaco amikacina y se utiliza para el tratamiento de la infección pulmonar causada por la bacteria *Mycobacterium avium complex* en pacientes adultos que no han respondido adecuadamente a otros regímenes de tratamiento. La inhalación de esta preparación liposomal ofrece la ventaja de una administración dirigida a los macrófagos pulmonares. Los macrófagos cargados de amikacina actúan entonces como depósito del fármaco, permitiendo una mayor eliminación bacteriana intracelular y extracelular.

Debido a que el empleo de nanofármacos ofrece numerosas ventajas en el tratamiento de enfermedades tan comunes como el cáncer o las infecciones bacterianas, resulta de suma importancia realizar nuevas investigaciones orientadas al desarrollo de estructuras funcionales que actúen como portadores de fármacos. Con la presente tesis doctoral, se ha pretendido contribuir al estudio de nuevas alternativas a los métodos convencionales de dosificación de fármacos.

## REFERENCIAS

- [1] National Nanotechnology Initiative (NNI). Available online: [www.nano.gov](http://www.nano.gov) (accessed on 1st May 2023), (n.d.).
- [2] R.P. Feynman, There's plenty of room at the bottom, *Resonance*. 16 (2011) 890–905. <https://doi.org/10.1007/s12045-011-0109-x>.
- [3] J.E. Hulla, S.C. Sahu, A.W. Hayes, Nanotechnology: History and future, *Human and Experimental Toxicology*. 34 (2015) 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>.
- [4] Available online: <https://theconversation.com/nanotecnologia-para-evitar-que-las-infecciones-se-conviertan-en-pandemia-133850> (accessed on 1st May 2023), (n.d.).
- [5] C. Xia, S. Zhu, T. Feng, M. Yang, B. Yang, Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots, *Advanced Science*. 6 (2019). <https://doi.org/10.1002/advs.201901316>.
- [6] X. Chen, C. Li, M. Grätzel, R. Kostecky, S.S. Mao, Nanomaterials for renewable energy production and storage, *Chemical Society Reviews*. 41 (2012) 7909–7937. <https://doi.org/10.1039/c2cs35230c>.
- [7] S. Logothetidis, Nanomedicine: The medicine of tomorrow, *NanoScience and Technology*. 61 (2012) 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-24181-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-24181-9_1).
- [8] S.W.S. Young, M. Stenzel, Y. Jia-Lin, Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 98 (2016) 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.015>.
- [9] H.S. Elsewedy, B.E.A. Dhubiab, M.A. Mahdy, H.M. Elnahas, Development, optimization, and evaluation of PEGylated brucine-loaded PLGA nanoparticles, *Drug Delivery*. 27 (2020) 1134–1146. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1797237>.
- [10] A.A. Lozano-Pérez, M.G. Montalbán, S.D. Aznar-Cervantes, F. Cragolini, J.L. Cenis, G. Villora, Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds, *Journal of Applied Polymer Science*. 132 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.41702>.
- [11] H. and G.T. Prathima Prabhu Tumkur, Nicole Nazario Bayon, Nithin Krishsha Gunasekaran, Babu R Lamani, Krishnan Prabhakaran, Joseph, Evaluation of Cellulose Nanoparticles Synthesized by Acid Hydrolysis for Safe Applications, *Journal of Nanosciences Research & Reports*. 2020 (2020) 1–4. [https://doi.org/10.47363/jnsrr/2020\(2\)113](https://doi.org/10.47363/jnsrr/2020(2)113).
- [12] S.D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S.A. Rutkowsky, C. Boritz, L. Mulfinger, Synthesis and study of silver nanoparticles, *Journal of Chemical Education*. 84 (2007) 322–325. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>.
- [13] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra, *Analytical Chemistry*. 79 (2007) 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac800834n>.
- [14] Z. Zhao, Y. Li, M. Bin Xie, Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery,

- International Journal of Molecular Sciences. 16 (2015) 4880–4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>.
- [15] R.P. Babu, K. O'Connor, R. Seeram, Current progress on bio-based polymers and their future trends, *Progress in Biomaterials*. 2 (2013) 8. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-2-8>.
- [16] S.A. Sell, P.S. Wolfe, K. Garg, J.M. McCool, I.A. Rodriguez, G.L. Bowlin, The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues, *Polymers*. 2 (2010) 522–553. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>.
- [17] K.C. de Castro, J.M. Costa, M.G.N. Campos, Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 71 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>.
- [18] O. Olatunji, Biomedical Application of Natural Polymers BT - Natural Polymers: Industry Techniques and Applications, in: O. Olatunji (Ed.), Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 93–114. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1_4).
- [19] C. Vepari, D.L. Kaplan, Silk as a biomaterial, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 32 (2007) 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>.
- [20] J. Saha, M.I. H. Mondal, M.R. Karim Sheikh, M.A. Habib, Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyx mori Silk Cocoon Waste, *Journal of Textile Science & Engineering*. 09 (2019). <https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000390>.
- [21] X. Chen, Z. Shao, D.P. Knight, F. Vollrath, Conformation Transition Kinetics of Bombyx mori Silk Protein, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 68 (2007) 223–231. <https://doi.org/10.1002/prot.21414>.
- [22] Z. Shao, F. Vollrath, Surprising strength of silkworm silk, *Nature*. 418 (2002) 741. <https://doi.org/10.1038/418741a>.
- [23] M. Wångren, Protein modelling by the zipping and assembly method with limited NMR-derived constraints, (2017).
- [24] A. Reizabal, C.M. Costa, L. Pérez-Álvarez, J.L. Vilas-Vilela, S. Lanceros-Méndez, Silk Fibroin as Sustainable Advanced Material: Material Properties and Characteristics, Processing, and Applications, *Advanced Functional Materials*. 33 (2023) 2210764.
- [25] Z. Xu, L. Shi, M. Yang, L. Zhu, Preparation and biomedical applications of silk fibroin-nanoparticles composites with enhanced properties - A review, *Materials Science and Engineering C*. 95 (2019) 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.010>.
- [26] H. Li, X. Zhang, H. Zheng, Y. Fan, T. Cheng, C. Liu, Identification and location of sericin in silkworm with anti-sericin antibodies, *International Journal of Biological Macromolecules*. 184 (2021) 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.044>.

- [27] G. Carissimi, A.A. Lozano-Pérez, M.G. Montalbán, S.D. Aznar-Cervantes, J.L. Cenis, G. Villora, Revealing the influence of the degumming process in the properties of silk fibroin nanoparticles, *Polymers*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/polym11122045>.
- [28] A. Reizabal, C.M. Costa, L. Pérez-Álvarez, J.L. Vilas-Vilela, S. Lanceros-Méndez, Silk Fibroin as Sustainable Advanced Material: Material Properties and Characteristics, Processing, and Applications, *Advanced Functional Materials*. 33 (2023) 1–25. <https://doi.org/10.1002/adfm.202210764>.
- [29] A. Bandyopadhyay, S.K. Chowdhury, S. Dey, J.C. Moses, B.B. Mandal, Silk: A Promising Biomaterial Opening New Vistas Towards Affordable Healthcare Solutions, *Journal of the Indian Institute of Science*. 99 (2019) 445–487. <https://doi.org/10.1007/s41745-019-00114-y>.
- [30] B. Yavuz, J. Zeki, J. Taylor, K. Harrington, J.M. Coburn, N. Ikegaki, D.L. Kaplan, B. Chiu, Silk Reservoirs for Local Delivery of Cisplatin for Neuroblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluations, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 108 (2019) 2748–2755. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.03.019>.
- [31] V. Pandey, T. Haider, A.R. Chandak, A. Chakraborty, S. Banerjee, V. Soni, Technetium labeled doxorubicin loaded silk fibroin nanoparticles: Optimization, characterization and in vitro evaluation, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 56 (2020) 101539. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101539>.
- [32] S. Perteghella, C. Sottani, V. Coccé, S. Negri, L. Cavicchini, G. Alessandri, D. Cottica, M.L. Torre, E. Grignani, A. Pessina, Paclitaxel-loaded silk fibroin nanoparticles: Method validation by UHPLC-MS/MS to assess an exogenous approach to load cytotoxic drugs, *Pharmaceutics*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060285>.
- [33] H. Rahmani, A. Fattahi, K. Sadrjavadi, S. Khaledian, Y. Shokoohinia, Preparation and characterization of silk fibroin nanoparticles as a potential drug delivery system for 5-fluorouracil, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 9 (2019) 601–608. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.069>.
- [34] F. Mottaghitalab, M. Kiani, M. Farokhi, S.C. Kundu, R.L. Reis, M. Gholami, H. Bardania, R. Dinarvand, P. Geramifar, D. Beiki, F. Atyabi, Targeted Delivery System Based on Gemcitabine-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Lung Cancer Therapy, *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9 (2017) 31600–31611. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10408>.
- [35] M. Wu, W. Yang, S. Chen, J. Yao, Z. Shao, X. Chen, Size-controllable dual drug-loaded silk fibroin nanospheres through a facile formation process, *Journal of Materials Chemistry B*. 6 (2018) 1179–1186. <https://doi.org/10.1039/c7tb03113k>.
- [36] M. Montalbán, J. Coburn, A. Lozano-Pérez, J. Cenis, G. Villora, D. Kaplan, Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy, *Nanomaterials*. 8 (2018) 126. <https://doi.org/10.3390/nano8020126>.
- [37] A.A. Lozano-Pérez, H.C. Rivero, M. del C. Pérez Hernández, A. Pagán, M.G. Montalbán, G. Villora, J.L. Cénis, Silk fibroin nanoparticles: Efficient vehicles for the natural antioxidant quercetin, *International Journal of Pharmaceutics*. 518 (2017) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.046>.

- [38] M.G. Fuster, M.G. Montalbán, G. Carissimi, G. Villora, Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles, *Nanomaterials*. 10 (2020) 718. <https://doi.org/doi:10.3390/nano10040718>.
- [39] M.G. Fuster, G. Carissimi, M.G. Montalbán, G. Villora, Antitumor Activity of Rosmarinic Acid-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles on HeLa and MCF-7 Cells, *Polymers*. 13 (2021) 3169.
- [40] A. Meincke, D. Hausdorf, N. Gadsden, M. Baumeister, M. Derrick, R. Newman, A. Rizzo, Cellulose nitrate coatings on furniture of the company of master craftsmen, *Journal of the American Institute for Conservation*. 48 (2009) 1–24. <https://doi.org/10.1179/019713609804528070>.
- [41] V.K. Thakur, ed., *Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons., New Jersey, 2015.
- [42] A. Pandey, M. Derakhshandeh, S.A. Kedzior, B. Pilapil, N. Shomrat, T. Segal-Peretz, S.L. Bryant, M. Trifkovic, Role of interparticle interactions on microstructural and rheological properties of cellulose nanocrystal stabilized emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*. 532 (2018) 808–818. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.08.044>.
- [43] S.H. Lee, M. Miyauchi, J.S. Dordick, R.J. Linhardt, Preparation of biopolymer-based materials using ionic liquids for the biomedical application, *ACS Symposium Series*. 1038 (2010) 115–134. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1038.ch010>.
- [44] R.T. Cullen, B.G. Miller, A.D. Jones, J.M.G. Davis, Toxicity of cellulose fibres, *Annals of Occupational Hygiene*. 46 (2002) 81–84. <https://doi.org/10.1093/annhyg/46.suppl-1.81>.
- [45] D.E. Ciolacu, R. Nicu, F. Ciolacu, Cellulose-based hydrogels as sustained drug-delivery systems, *Materials*. 13 (2020) 1–37. <https://doi.org/10.3390/ma13225270>.
- [46] H. Feng, L. Zhang, C. Zhu, Genipin crosslinked ethyl cellulose-chitosan complex microspheres for anti-tuberculosis delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 103 (2013) 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.007>.
- [47] A. Sheikhi, J. Hayashi, J. Eichenbaum, M. Gutin, N. Kuntjoro, D. Khorsandi, A. Khademhosseini, Recent advances in nanoengineering cellulose for cargo delivery, *Journal of Controlled Release*. 294 (2019) 53–76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.11.024>.
- [48] T. Mohan, A. Dobaj Štiglic, M. Beaumont, J. Konnerth, F. Gürer, D. Makuc, U. Maver, L. Gradišnik, J. Plavec, R. Kargl, K. Stana Kleinschek, Generic Method for Designing Self-Standing and Dual Porous 3D Bioscaffolds from Cellulosic Nanomaterials for Tissue Engineering Applications, *ACS Applied Bio Materials*. 3 (2020) 1197–1209. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01099>.
- [49] H.J. Branicky, *Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control*, *Journal (Canadian Dental Association)*. 58 (1992) 688.
- [50] S. Wang, Y. Lu, X. kun Ouyang, J. Ling, Fabrication of soy protein isolate/cellulose nanocrystal composite nanoparticles for curcumin delivery,

- International Journal of Biological Macromolecules. 165 (2020) 1468–1474. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.046>.
- [51] D. Thomas, M.S. Latha, K.K. Thomas, Synthesis and in vitro evaluation of alginate-cellulose nanocrystal hybrid nanoparticles for the controlled oral delivery of rifampicin, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 46 (2018) 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.004>.
- [52] X. Zhang, X. Liu, W. Zheng, J. Zhu, Regenerated cellulose/graphene nanocomposite films prepared in DMAC/LiCl solution, *Carbohydrate Polymers*. 88 (2012) 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.054>.
- [53] N. Tamai, D. Tatsumi, T. Matsumoto, Rheological properties and molecular structure of tunicate cellulose in LiCl/1,3-dimethyl-2-imidazolidinone, *Biomacromolecules*. 5 (2004) 422–432. <https://doi.org/10.1021/bm034236h>.
- [54] H. Zhao, J.H. Kwak, Y. Wang, J.A. Franz, J.M. White, J.E. Holladay, Interactions between cellulose and N-methylmorpholine-N-oxide, *Carbohydrate Polymers*. 67 (2007) 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.019>.
- [55] J. Al Hakkak, W.J. Grigsby, K. Kathirgamanathan, N.R. Edmonds, Generation of Spherical Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Processing via Novel Nonsolvent Addition and Drying, *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/2081027>.
- [56] J.N. Putro, S. Ismadji, C. Gunarto, F.E. Soetaredjo, Y.H. Ju, Effect of natural and synthetic surfactants on polysaccharide nanoparticles: Hydrophobic drug loading, release, and cytotoxic studies, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 578 (2019) 123618. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123618>.
- [57] Y.C. Ching, T.M.S.U. Gunathilake, C.H. Chuah, K.Y. Ching, R. Singh, N.S. Liou, Curcumin/Tween 20-incorporated cellulose nanoparticles with enhanced curcumin solubility for nano-drug delivery: characterization and in vitro evaluation, *Cellulose*. 26 (2019) 5467–5481. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02445-6>.
- [58] B.A. Cheba, Chitosan: Properties, modifications and food nanobiotechnology, *Procedia Manufacturing*. 46 (2020) 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.03.093>.
- [59] B. Soni, B. Mahmoud, S. Chang, E.M. El-Giar, E.B. Hassan, Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films, *Food Packaging and Shelf Life*. 17 (2018) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.001>.
- [60] A. Khan, K.A. Alamry, Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review, *Carbohydrate Research*. 506 (2021) 108368. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108368>.
- [61] E.M.R. Ibrahim, H. M., & El-Zairy, Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers, in: *InTech*, 2015. <https://doi.org/10.5772/61300>.
- [62] J. Desbrières, E. Guibal, Chitosan for wastewater treatment, *Polymer International*. 67 (2018) 7–14. <https://doi.org/10.1002/pi.5464>.

- [63] Y. Xing, Q. Xu, X. Li, C. Chen, L. Ma, S. Li, Z. Che, H. Lin, Chitosan-based coating with antimicrobial agents: Preparation, property, mechanism, and application effectiveness on fruits and vegetables, *International Journal of Polymer Science*. 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/4851730>.
- [64] T. Dai, M. Tanaka, Y. Huang, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Reviews*. 9 (2011) 857–880.
- [65] V. Djoković, D.K. Božanic, V. V. Vodnik, R.M. Krsmanović, L. V. Trandafilovic, S. Dimitrijević-Branković, Structure and optical properties of noble metal and oxide nanoparticles dispersed in various polysaccharide biopolymers, *Physical Chemistry of Interfaces and Nanomaterials X*. 8098 (2011) 809816. <https://doi.org/10.1117/12.899934>.
- [66] K.D.N. Vo, E. Guillon, L. Dupont, C. Kowandy, X. Coqueret, Influence of Au(III) interactions with chitosan on gold nanoparticle formation, *Journal of Physical Chemistry C*. 118 (2014) 4465–4474. <https://doi.org/10.1021/jp4112316>.
- [67] A. Leiva, S. Bonardd, M. Pino, C. Saldías, G. Kortaberria, D. Radić, Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles, *European Polymer Journal*. 68 (2015) 419–431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.032>.
- [68] A. Pestov, A. Nazirov, E. Modin, A. Mironenko, S. Bratskaya, Mechanism of Au(III) reduction by chitosan: Comprehensive study with <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR analysis of chitosan degradation products, *Carbohydrate Polymers*. 117 (2015) 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.030>.
- [69] H. Katas, C.S. Lim, A.Y.H. Nor Azlan, F. Buang, M.F. Mh Busra, Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan, *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27 (2019) 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.010>.
- [70] M.A.M. Hussein, M. Grinholc, A.S.A. Dena, I.M. El-Sherbiny, M. Megahed, Boosting the antibacterial activity of chitosan–gold nanoparticles against antibiotic–resistant bacteria by *Punicagranatum L.* extract, *Carbohydrate Polymers*. 256 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117498>.
- [71] R.L. Siegel, K.D. Miller, N.S. Wagle, A. Jemal, *Cancer statistics, 2023*, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 73 (2023) 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
- [72] M. Ashrafizadeh, A. Zarrabi, H. Karimi-Maleh, A. Taheriazam, S. Mirzaei, M. Hashemi, K. Hushmandi, P. Makvandi, E. Nazarzadeh Zare, E. Sharifi, A. Goel, L. Wang, J. Ren, Y. Nuri Ertas, A.P. Kumar, Y. Wang, N. Rabiee, G. Sethi, Z. Ma, (Nano)platforms in bladder cancer therapy: Challenges and opportunities, *Bioengineering and Translational Medicine*. 8 (2023) 1–28. <https://doi.org/10.1002/btm2.10353>.
- [73] T. Pulingam, T. Parumasivam, A.M. Gazzali, A.M. Sulaiman, J.Y. Chee, M. Lakshmanan, C.F. Chin, K. Sudesh, Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 170 (2022) 106103. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>.

- [74] K. Szafranska, C.F. Holte, L.D. Kruse, H. Mao, C.I. Øie, M. Szymonski, B. Zapotoczny, P.A.G. McCourt, Quantitative analysis methods for studying fenestrations in liver sinusoidal endothelial cells. A comparative study, *Micron*. 150 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103121>.
- [75] T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62 (2010) 1607–1621. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x>.
- [76] V. Bhardwaj, D.D. Ankola, S.C. Gupta, M. Schneider, C.M. Lehr, M.N.V.R. Kumar, PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: Safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat, *Pharmaceutical Research*. 26 (2009) 2495–2503. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9965-4>.
- [77] D.B. Shenoy, M.M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, *International Journal of Pharmaceutics*. 293 (2005) 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.010>.
- [78] J.F. Huang, J. Zhong, G.P. Chen, Z.T. Lin, Y. Deng, Y.L. Liu, P.Y. Cao, B. Wang, Y. Wei, T. Wu, J. Yuan, G.B. Jiang, A Hydrogel-Based Hybrid Theranostic Contact Lens for Fungal Keratitis, *ACS Nano*. 10 (2016) 6464–6473. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00601>.
- [79] B.S. Lee, C.C. Lee, Y.P. Wang, H.J. Chen, C.H. Lai, W.L. Hsieh, Y.W. Chen, Controlled-release of tetracycline and lovastatin by poly(D,L-lactide-co-glycolide acid)-chitosan nanoparticles enhances periodontal regeneration in dogs, *International Journal of Nanomedicine*. 11 (2016) 285–297. <https://doi.org/10.2147/IJN.S94270>.
- [80] M.G. Fuster, M.G. Montalb, I. Moulefera, V. Gloria, Folic Acid-Modified Ibrutinib-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Cell Therapy with Over-Expressed Folate Receptor, (2023).
- [81] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerjee, Drug delivery systems: An updated review, 2 (2012). <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>.
- [82] J. Lu, X. Gao, S. Wang, Y. He, X. Ma, T. Zhang, X. Liu, Advanced strategies to evade the mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials, *Exploration*. 3 (2023) 20220045. <https://doi.org/10.1002/exp.20220045>.
- [83] M. Rawat, N.S. Bisht, S. Jaswal, R. Joshi, S. Bisht, Formulation Strategies against Opsonization Recognition: Prerequisite for Long Circulatory Systemic Drug Delivery, 8 (2023) 2127–2144. <https://doi.org/10.35629/7781-080121272144>.
- [84] S. Kobayashi, K. Müllen, *Encyclopedia of polymeric nanomaterials*, Springer Berlin Heidelberg Berlin Heidelberg, 2015.
- [85] T. Wang, L. Wang, X. Li, X. Hu, Y. Han, Y. Luo, Z. Wang, Q. Li, A. Aldalbahi, L. Wang, S. Song, C. Fan, Y. Zhao, M. Wang, N. Chen, Size-Dependent Regulation of Intracellular Trafficking of Polystyrene Nanoparticle-Based Drug-Delivery Systems, *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9 (2017) 18619–18625. <https://doi.org/10.1021/acsmi.7b05383>.

- [86] J.W. Shreffler, J.E. Pullan, K.M. Dailey, S. Mallik, A.E. Brooks, Overcoming Hurdles in Nanoparticle Clinical Translation : The Influence of Experimental Design and Surface Modification, (2019) 1–25.
- [87] G. Davidov-Pardo, I.J. Joye, D.J. McClements, Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization, 1st ed., Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.004>.
- [88] B. Mishra, B.B. Patel, S. Tiwari, Colloidal nanocarriers : a review on formulation technology , types and applications toward targeted drug delivery, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6 (2010) 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.008>.
- [89] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*. 26 (2005) 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- [90] X. Qi, R.F. Tester, Bioadhesive Properties of  $\beta$ -Limit Dextrin, 14 (2011) 60–66.
- [91] F. Danhier, O. Feron, V. Pr at, To exploit the tumor microenvironment : Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*. 148 (2015) 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>.
- [92] M. Dellian, F. Yuan, V.S. Trubetskoy, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Vascular permeability in a human tumour xenograft: Molecular charge dependence, *British Journal of Cancer*. 82 (2000) 1513–1518.
- [93] Y. Nakamura, A. Mochida, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Nano-drug delivery : Is the enhanced permeability and retention ( EPR ) effect sufficient for curing cancer ?, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00437>.
- [94] A.M. Jhaveri, V.P. Torchilin, Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA, *Frontiers in Pharmacology*. 5 APR (2014) 1–26. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00077>.
- [95] D. Press, Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors, (2017) 7291–7309.
- [96] N. Chen, Z. Zhang, B. Soontornworajit, J. Zhou, Y. Wang, Cell adhesion on an artificial extracellular matrix using aptamer-functionalized PEG hydrogels, *Biomaterials*. 33 (2012) 1353–1362. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.062>.
- [97] A. Narmani, M. Rezvani, B. Farhood, P. Darkhor, J. Mohammadnejad, B. Amini, S. Refahi, N. Abdi Goushbolagh, Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems, *Drug Development Research*. 80 (2019) 404–424. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>.
- [98] Y. Chen, Q. Chen, Q. Zhu, J. Liu, Y. Li, X. Gao, D. Chen, X. Zhu, Small Molecular Theranostic Assemblies Functionalized by Doxorubicin – Hyaluronic Acid – Methotrexate Prodrug for Multiple Tumor Targeting and Imaging-Guided Combined Chemo- Photothermal Therapy, *Molecular Pharmaceutics*. 16 (2019) 2470–2480. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00072>.

- [99] F. Fathian kolahkaj, K. Derakhshandeh, F. Khaleseh, A.H. Azandaryani, K. Mansouri, M. Khazaei, Active targeting carrier for breast cancer treatment: Monoclonal antibody conjugated epirubicin loaded nanoparticle, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 53 (2019) 101136. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101136>.
- [100] L.E. Scheeren, D.R. Nogueira-Librelotto, L.B. Macedo, J.M. de Vargas, M. Mitjans, M.P. Vinardell, C.M.B. Rolim, Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with pH-responsive behavior: a synergistic approach for cancer therapy, *Journal of Nanoparticle Research*. 22 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04798-7>.
- [101] M.M. Khan, A. Madni, N. Filipczak, J. Pan, M. Rehman, N. Rai, S.A. Attia, V.P. Torchilin, Folate targeted lipid chitosan hybrid nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 28 (2020) 102228. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102228>.
- [102] G. Sanità, B. Carrese, A. Lamberti, Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization, *Frontiers in Molecular Biosciences*. 7 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>.
- [103] J. Chen, Z. Xu, Y. Liu, A.X. Mei, X. Wang, Q. Shi, Cellular absorption of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization and the toxicity to RAW264.7 macrophage cells, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 252 (2023) 114574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114574>.
- [104] F. Nicolson, A. Ali, M.F. Kircher, S. Pal, DNA Nanostructures and DNA-Functionalized Nanoparticles for Cancer Theranostics, *Advanced Science*. 7 (2020) 1–27. <https://doi.org/10.1002/adv.202001669>.
- [105] Z. Fan, P. Zhu, Y. Zhu, K. Wu, C.Y. Li, H. Cheng, Engineering long-circulating nanomaterial delivery systems, *Current Opinion in Biotechnology*. 66 (2020) 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.07.006>.
- [106] Z. Zhao, A. Ukidve, V. Krishnan, S. Mitragotri, Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 143 (2019) 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.002>.
- [107] H.D. Moreau, C. Blanch-Mercader, R. Attia, M. Maurin, Z. Alraies, D. Sanséau, O. Malbec, M.G. Delgado, P. Bousso, J.F. Joanny, R. Voituriez, M. Piel, A.M. Lennon-Duménil, Macropinocytosis Overcomes Directional Bias in Dendritic Cells Due to Hydraulic Resistance and Facilitates Space Exploration, *Developmental Cell*. 49 (2019) 171-188.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.024>.
- [108] C. Buono, J.J. Anzinger, M. Amar, H.S. Kruth, Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions, *Journal of Clinical Investigation*. 119 (2009) 1373–1381. <https://doi.org/10.1172/JCI35548>.
- [109] U. Djakbarova, Y. Madraki, E.T. Chan, C. Kural, Dynamic interplay between cell membrane tension and clathrin-mediated endocytosis, *Biology of the Cell*. 113 (2021) 344–373. <https://doi.org/10.1111/boc.202000110>.
- [110] L. Izem, K. Bialkowska, E. Pluskota, M. Das, R. Das, M.T. Nieman, E.F. Plow,

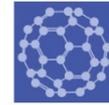
- Plasminogen-induced foam cell formation by macrophages occurs through a histone 2B (H2B)-PAR1 pathway and requires integrity of clathrin-coated pits, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 19 (2021) 941–953. <https://doi.org/10.1111/jth.15253>.
- [111] I.R. Nabi, P.U. Le, Caveolae/raft-dependent endocytosis, *Journal of Cell Biology*. 161 (2003) 673–677. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302028>.
- [112] R.V. Stan, Structure and function of endothelial caveolae, *Microscopy Research and Technique*. 57 (2002) 350–364. <https://doi.org/10.1002/jemt.10089>.
- [113] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters*. 6 (2006) 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>.
- [114] I.M. Adjei, B. Sharma, V. Labhasetwar, Nanoparticles Cellular Uptake and Cytotoxicity, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 811 (2014) 73–91. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0>.
- [115] S. Guo, Y. Liang, L. Liu, M. Yin, A. Wang, K. Sun, Y. Li, Y. Shi, Research on the fate of polymeric nanoparticles in the process of the intestinal absorption based on model nanoparticles with various characteristics: size, surface charge and pro-hydrophobics, *Journal of Nanobiotechnology*. 19 (2021) 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00770-2>.
- [116] Y. Huang, K. Jiang, X. Zhang, E.J. Chung, The effect of size, charge, and peptide ligand length on kidney targeting by small, organic nanoparticles, *Bioengineering and Translational Medicine*. 5 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/btm2.10173>.
- [117] M.J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, S.-D. Li, Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles, *Control Release*. 172 (2013) 782–794. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.013>.
- [118] W. Wu, L. Luo, Y. Wang, Q. Wu, H. Dai, J. Li, C. Durkan, N. Wang, Endogenous pH-responsive nanoparticles with programmable size changes for targeted tumor therapy and imaging applications, 8 (2018). <https://doi.org/10.7150/thno.23459>.
- [119] S. Bhatia, *Nanoparticles Types , Classification , Characterization , Fabrication Methods*, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>.
- [120] F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *Journal of Controlled Release*. 244 (2016) 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- [121] S. Maman, I.P. Witz, A history of exploring cancer in context, *Nature Reviews Cancer*. 18 (2018) 359–376. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7>.
- [122] Y. Zhou, X. Chen, J. Cao, H. Gao, Overcoming the biological barriers in the tumor microenvironment for improving drug delivery and efficacy, *Journal of Materials Chemistry B*. 8 (2020) 6765–6781. <https://doi.org/10.1039/d0tb00649a>.
- [123] W. Jiang, B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent, *Nature Nanotechnology*. 3 (2008) 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.

- [124] A. Avellan, J. Yun, Y. Zhang, E. Spielman-Sun, J.M. Unrine, J. Thieme, J. Li, E. Lombi, G. Bland, G. V. Lowry, Nanoparticle Size and Coating Chemistry Control Foliar Uptake Pathways, Translocation, and Leaf-to-Rhizosphere Transport in Wheat, *ACS Nano*. 13 (2019) 5291–5305. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09781>.
- [125] M. Wu, H. Guo, L. Liu, Y. Liu, L. Xie, Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*. 14 (2019) 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>.
- [126] M. Safi, J. Courtois, M. Seigneuret, H. Conjeaud, J.F. Berret, The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles, *Biomaterials*. 32 (2011) 9353–9363. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.048>.
- [127] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [128] S. Salatin, S. Maleki Dizaj, A. Yari Khosroushahi, Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles, *Cell Biology International*. 39 (2015) 881–890. <https://doi.org/10.1002/cbin.10459>.
- [129] R. Mathaes, G. Winter, A. Besheer, J. Engert, Influence of particle geometry and PEGylation on phagocytosis of particulate carriers, *International Journal of Pharmaceutics*. 465 (2014) 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.02.037>.
- [130] Y. Yang, D. Nie, Y. Liu, M. Yu, Y. Gan, Advances in particle shape engineering for improved drug delivery, *Drug Discovery Today*. 24 (2019) 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.10.006>.
- [131] A. Verma, F. Stellacci, Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, *Small*. 6 (2010) 12–21. <https://doi.org/10.1002/smll.200901158>.
- [132] M.J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, S.-D. Li, Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles, *J Control Release*. 172 (2013) 782–794. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.013.Factors>.
- [133] J.L. Sampaio, M.J. Gerl, C. Klose, C.S. Ejsing, H. Beug, K. Simons, A. Shevchenko, Membrane lipidome of an epithelial cell line, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (2011) 1903–1907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019267108>.
- [134] R. Schauer, Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions, *Current Opinion in Structural Biology*. 19 (2009) 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.003>.
- [135] M. Saadat, F. Zahednezhad, P. Zakeri-Milani, H.R. Heidari, J. Shahbazi-Mojarrad, H. Valizadeh, Drug targeting strategies based on charge dependent uptake of nanoparticles into cancer cells, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 22 (2019) 191–220. <https://doi.org/10.18433/jpps30318>.

- [136] J. Di, X. Gao, Y. Du, H. Zhang, J. Gao, A. Zheng, Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16 (2021) 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.005>.
- [137] D. Musino, C. Rivard, G. Landrot, B. Novales, T. Rabilloud, I. Capron, Hydroxyl groups on cellulose nanocrystal surfaces form nucleation points for silver nanoparticles of varying shapes and sizes, *Journal of Colloid and Interface Science*. 584 (2021) 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.09.082>.
- [138] F. Xu, Y. Yuan, X. Shan, C. Liu, X. Tao, Y. Sheng, H. Zhou, Long-circulation of hemoglobin-loaded polymeric nanoparticles as oxygen carriers with modulated surface charges, *International Journal of Pharmaceutics*. 377 (2009) 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.015>.
- [139] P. Xie, P. Liu, pH-responsive surface charge reversal carboxymethyl chitosan-based drug delivery system for pH and reduction dual-responsive triggered DOX release, *Carbohydrate Polymers*. 236 (2020) 116093. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116093>.
- [140] A. Ahmed, S. Liu, Y. Pan, S. Yuan, J. He, Y. Hu, Multicomponent Polymeric Nanoparticles Enhancing Intracellular Drug Release in Cancer Cells, (2014).
- [141] C. Xu, R. Song, P. Lu, J. Chen, Y. Zhou, G. Shen, M. Jiang, W. Zhang, A pH-Responsive Charge-Reversal Drug Delivery System with Tumor-Specific Drug Release and ROS Generation for Cancer Therapy, *International Journal Of Nanomedicine*. (2020) 65–80.
- [142] Y. Hu, X. Gong, J. Zhang, F. Chen, C. Fu, P. Li, L. Zou, G. Zhao, Activated Charge-Reversal Polymeric Nano-System: The Promising Strategy in Drug Delivery for Cancer therapy, *Polymers*. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8040099>.
- [143] N. Hinge, M.M. Pandey, G. Singhvi, G. Gupta, M. Mehta, S. Satija, M. Gulati, H. Dureja, K. Dua, *Nanomedicine advances in cancer therapy*, Elsevier Inc., 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818471-4.00008-x>.
- [144] Y.C. Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release*. 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [145] W.J. Gradishar, Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane, (2006).
- [146] Y.H. Choi, H.K. Han, Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics, *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 48 (2018) 43–60. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0370-4>.
- [147] H.J. Lee, H.H. Park, Y. Sohn, J. Ryu, J.H. Park, W.J. Rhee, T.H. Park,  $\alpha$ -Galactosidase delivery using 30Kc19-human serum albumin nanoparticles for effective treatment of Fabry disease, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (2016) 10395–10402. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7689-z>.
- [148] K.M. Rubey, J.S. Brenner, Nanomedicine to fight infectious disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 179 (2021) 113996. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113996>.

# 1

## **Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles**



Revista: Nanomaterials

Título: Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles

Autores: Marta G. Fuster, Guzmán Carissimi, Mercedes G. Montalbán and Gloria Villora

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Murcia (UMU),  
Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Resumen:

Naringenin (NAR), a flavonoid present in a variety of fruits, vegetables and herbs, exhibits a wide range of pharmacological effects, including anticancer activity. Nevertheless, its application in cancer therapy is limited due to its low bioavailability at the tumour site because of its poor solubility in water and slow disso-

lution rate. To improve the therapeutic efficacy of NAR, emergent research is looking into using nanocarriers. Silk fibroin (SF), from the *Bombyx mori* silkworm, is a biocompatible and biodegradable polymer with excellent mechanical properties and an amphiphilic chemistry that make it a promising candidate as a controlled release drug system. The aim of this work is to synthesize naringenin-loaded silk fibroin nanoparticles (NAR-SFNs) by dissolving the SF in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, using high-power ultrasounds and rapid desolvation in methanol followed by the adsorption of NAR. The NAR-SFNs were characterized by dynamic light scattering, Fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. The drug loading content and encapsulation efficiency were calculated. The drug release profile best fitted a first order equation. The cytotoxicity effects of free NAR, bare silk fibroin nanoparticles (SFNs) and NAR-SFNs were assessed on HeLa and EA.hy926 cells via 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The results demonstrated the higher in vitro anticancer potential of synthesized NAR-SFNs than that of free NAR in HeLa cancer cells.

Dirección URL: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/4/718>

# 2

**Antitumor activity of rosmarinic acid-loaded silk fibroin nanoparticles on HeLa and MCF-7 cells**

Revista: Polymers

Título: Antitumor Activity of Rosmarinic Acid-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles on HeLa and MCF-7 Cells

Autores: Marta G. Fuster, Guzmán Carissimi, Mercedes G. Montalbán and Gloria Villora

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Murcia (UMU), Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Resumen:

Rosmarinic acid (RA), one of the most important polyphenol-based antioxidants, has drawn increasing attention because of its remarkable bioactive properties, including anti-inflammatory, anticancer and antibacterial activities. The aim of this study was to synthesize and characterize RA-loaded silk fibroin nanoparticles (RA-SFNs) in terms of their physical–chemical features and composition, and to investigate their antitumor activity against human cervical carcinoma and breast cancer cell lines (HeLa and MCF-7). Compared with the free form, RA bioavailability was enhanced when the drug was adsorbed onto the surface of the silk fibroin nanoparticles (SFNs). The resulting particle diameter was 255 nm, with a polydispersity index of 0.187, and the Z-potential was  $-17$  mV. The drug loading content of the RA-SFNs was 9.4 wt.%. Evaluation of the in vitro drug release of RA from RA-SFNs pointed to a rapid release in physiological conditions (50% of the total drug content was released in 0.5 h). Unloaded SFNs exhibited good biocompatibility, with no significant cytotoxicity observed during the first 48 h against HeLa and MCF-7 cancer cells. In contrast, cell death increased in a concentration-dependent manner after treatment with RA-SFNs, reaching an IC<sub>50</sub> value of 1.568 and 1.377 mg/mL on HeLa and MCF-7, respectively. For both cell lines, the IC<sub>50</sub> of free RA was higher. The cellular uptake of the nanoparticles studied was increased when RA was loaded on them. The cell cycle and apoptosis studies revealed that RA-SFNs inhibit cell proliferation and induce apoptosis on HeLa and MCF-7 cell lines. It is concluded, therefore, that the RA delivery platform based on SFNs improves the antitumor potential of RA in the case of the above cancers.

Dirección URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/18/3169>

# 3

**Folic acid-modified Ibrutinib-loaded silk fibroin nanoparticles for cancer cell therapy with over-expressed folate receptor**

Revista: Pharmaceutics

Título: Folic Acid-Modified Ibrutinib-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Cell Therapy with Over-Expressed Folate Receptor

Autores: Marta G. Fuster <sup>1</sup>, Mercedes G. Montalbán <sup>1</sup>, Imane Moulefera <sup>1</sup>, Gloria Villora <sup>1</sup> and David L. Kaplan <sup>2</sup>

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Murcia (UMU), Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain
2. Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Medford, MA 02155, USA

Resumen:

The anticancer drug ibrutinib (IB), also known as PCI-32765, is a compound that irreversibly inhibits Bruton's tyrosine kinase (BTK) and was initially developed as a treatment option for B-cell lineage neoplasms. Its action is not limited to B-cells, as it is expressed in all hematopoietic lineages and plays a crucial role in the tumor microenvironment. However, clinical trials with the drug have resulted in conflicting outcomes against solid tumors. In this study, folic acid-conjugated silk nanoparticles were used for the targeted delivery of IB to the cancer cell lines HeLa, BT-474, and SKBR3 by exploiting the overexpression of folate receptors on their surfaces. The results were compared with those of control healthy cells (EA.hy926). Cellular uptake studies confirmed total internalization of the nanoparticles functionalized by this procedure in the cancer cells after 24 h, compared to nanoparticles not functionalized with folic acid, suggesting that cellular uptake was mediated by folate receptors overexpressed in the cancer cells. The results indicate that the developed nanocarrier can be used for drug targeting applications by enhancing IB uptake in cancer cells with folate receptor overexpression.

Dirección URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/4/1186>

# 4

## **Synthesis of Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Solutions for Biomedical Applications**

Revista: Polymers

Título: Synthesis of Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Solutions for Biomedical Applications

Autores: Marta G. Fuster, Imane Moulefera, M. Noelia Muñoz, Mercedes G. Montalbán and Gloria Villora

Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Murcia (UMU), Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

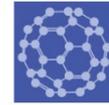
Resumen:

A method for the synthesis of cellulose nanoparticles using the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate has been optimised. The use of a highly biocompatible biopolymer such as cellulose, together with the use of an ionic liquid, makes this method a promising way to obtain nanoparticles with good capability for drug carrying. The operating conditions of the synthesis have been optimised based on the average hydrodynamic diameter, the polydispersity index, determined by Dynamic Light Scattering (DLS) and the Z-potential, obtained by phase analysis light scattering (PALS), to obtain cellulose nanoparticles suitable for use in biomedicine. The obtained cellulose nanoparticles have been characterised by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with attenuated total reflectance (ATR), field emission scanning electron microscopy (FESEM) and thermogravimetric analysis (TGA/DTA). Finally, cell viability studies have been performed with a cancer cell line (HeLa) and with a healthy cell line (EA.hy926). These have shown that the cellulose nanoparticles obtained are not cytotoxic in the concentration range of the studied nanoparticles. The results obtained in this work constitute a starting point for future studies on the use of cellulose nanoparticles, synthesised from ionic liquids, for biomedical applications such as targeted drug release or controlled drug release.

Dirección URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/2/382>

# 5

**Antibacterial effect of chitosan-gold nanoparticles and  
computational modelling of the interaction between  
chitosan and a lipid bilayer model**



Revista: Nanomaterials

Título: Antibacterial Effect of Chitosan–Gold Nanoparticles and Computational Modeling of the Interaction between Chitosan and a Lipid Bilayer Model

Autores: Marta. G. Fuster <sup>1</sup>, Mercedes. G. Montalbán <sup>1</sup>, Guzmán Carissimi <sup>1</sup>, Beatriz Lima <sup>2,3</sup>, Gabriela. E. Feresin <sup>2,3</sup>, Manuel Cano <sup>4</sup>, Juan José Giner-Casares <sup>4</sup>, José Javier López-Cascales <sup>5</sup>, R. Daniel Enriz <sup>6</sup> and Gloria Villora <sup>1</sup>

1. Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.
2. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan, Av. Libertador General San Martín 1109 (O), San Juan CP 5400, Argentina.
3. CONICET (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), CABA, Buenos Aires C1405DJR, Argentina
4. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, Instituto Universitario de Nanoquímica (IUNAN), Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14071 Córdoba, Spain.
5. Departamento Ingeniería Química y Ambiental, Campus Alfonso XIII, Universidad Politécnica de Cartagena, Aulario C, Cartagena, 30203 Murcia, Spain.
6. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL), CONICET, Universidad Nacional de San Luis, Ejército de los Andes 950, San Luis 5700, Argentina.

Resumen:

Pathogenic bacteria have the ability to develop antibiotic resistance mechanisms. Their action consists mainly in the production of bacterial enzymes that inactivate antibiotics or the appearance of modifications that prevent the arrival of the drug at the target point or the alteration of the target point itself, becoming a growing problem for health systems. Chitosan–gold nanoparticles (Cs-AuNPs) have been shown as effective bactericidal materials avoiding damage to human cells. In this work, Cs-AuNPs were synthesized using chitosan as the reducing agent, and a systematic analysis of the influence of the synthesis parameters on the size and zeta potential of the Cs-AuNPs and their UV-vis spectra was carried out. We used a simulation model to characterize the interaction of chitosan with bacterial membranes, using a symmetric charged bilayer and two different chitosan models with different degrees of the chitosan amine protonation as a function of pH, with the aim to elucidate the antibacterial mechanism involving the cell wall disruption. The Cs-AuNP antibacterial activity was evaluated to check the simulation model.

Dirección URL: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/12/2340>

# **Conclusiones**

## CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se han sintetizado de forma satisfactoria nanopartículas biopoliméricas y se ha estudiado su uso como nanoportadores de fármacos anticancerígenos o antibacterianos. Dichas nanopartículas, dependiendo de la naturaleza del biopolímero, del fármaco y de su potencial aplicación, han sido caracterizadas a) en base al contenido de fármaco cargado, eficiencia de encapsulación y liberación in vitro del fármaco, b) desde el punto de vista fisicoquímico en base a su tamaño, potencial zeta, morfología, estructura química y estabilidad térmica y c) en base a su bioactividad en células tumorales y sanas o en cepas bacterianas.

Con respecto a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con fármacos anticancerígenos los principales logros obtenidos han sido los siguientes:

1. El valor más alto del Contenido de Carga de Fármaco (21.82%) de las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con naringenina se alcanza con la relación en peso NAR/SFN de 1:1.
2. Para el mayor valor de Contenido de Carga de Fármaco, las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con naringenina tienen un diámetro hidrodinámico de 180 nm y un potencial zeta de -30.5 mV, valores muy adecuados para su posterior aplicación.
3. Las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con naringenina muestran una mayor citotoxicidad que la naringenina libre en las células tumorales HeLa, pero menor en células sanas EA.hy926.
4. Las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ácido rosmarínico tienen un valor del Contenido de Carga de Fármaco del 9.4% y unos valores de diámetro hidrodinámico y potencial zeta de 255 nm y -17 mV, respectivamente.
5. Las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ácido rosmarínico muestran una mayor citotoxicidad que el ácido rosmarínico libre en las células tumorales HeLa y MCF-7.
6. Los ensayos de internalización celular muestran que las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ácido rosmarínico tienen una mejor captación por las células que las nanopartículas de fibroína de seda sin fármaco.
7. Los estudios realizados sobre el ciclo celular y apoptosis/necrosis revelan que las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ácido rosmarínico inducen la apoptosis en células tumorales en HeLa y MCF-7.

8. Las nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ibrutinib tienen un valor del Contenido de Carga de Fármaco del 10.2% y unos valores de diámetro hidrodinámico y potencial zeta de 156 nm y -36 mV, respectivamente.
9. El método óptimo para funcionalizar las nanopartículas de fibroína de seda con ácido fólico es el que emplea polietilenimina como enlace entre la fibroína de seda y el ácido fólico.
10. Las nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico mantienen un valor del Contenido de Carga de Fármaco del 10.2% y poseen unos valores de diámetro hidrodinámico y potencial zeta de 203 nm y 21.6 mV, respectivamente.
11. El tratamiento de células tumorales HeLa, BT-474 y SKBR3 con las nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico inhibe el crecimiento celular en mayor medida que las nanopartículas cargadas con ibrutinib pero sin funcionalizar.
12. Las nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico no disminuyen de forma significativa la viabilidad de las células sanas Ea.hy926.
13. Los estudios de captación celular muestran una mayor internalización de las nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico en comparación con las nanopartículas sin funcionalizar lo que sugiere que la captación es mediada por receptores folato, sobreexpresados en las células tumorales.
14. Cuando las células cancerosas son tratadas con nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico, la detención del ciclo celular tiene lugar en la fase G1.
15. Los ensayos de apoptosis/necrosis revelan que las células mueren por apoptosis cuando son tratadas con nanopartículas cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico.

Con respecto a la síntesis de nanopartículas de celulosa los principales logros obtenidos son los que se detallan a continuación:

1. Las condiciones óptimas de síntesis de nanopartículas de celulosa son 200 mL de acetonitrilo como antisolvente, 80 °C de temperatura y 1 bar de presión.
2. Las nanopartículas de celulosa tienen un valor del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta de 233 nm y 28.5 mV, respectivamente.

3. Las nanopartículas de celulosa no son citotóxicas en células cancerosas HeLa ni en la línea celular sana Ea.hy926 en el rango de concentración de nanopartículas estudiado.

Con respecto a la síntesis de nanopartículas antibacterianas de oro y quitosano los principales logros obtenidos son los que se enumeran a continuación:

1. El tamaño de las nanopartículas de oro y quitosano depende en mayor medida de la concentración de quitosano que de su peso molecular.
2. Es necesario un tamaño crítico de las nanopartículas de oro y quitosano por encima de 150 nm y un potencial zeta de alrededor de 50 mV para producir un efecto antibacteriano significativo frente a las bacterias estudiadas.
3. Los resultados de la simulación molecular están en concordancia con la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de oro y quitosano, mostrando que la densidad de carga es un parámetro crítico para dicha actividad.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden resumir afirmando que se ha profundizado en el conocimiento de la síntesis y caracterización de nuevas nanoestructuras, contribuyendo al estudio y diseño de nuevos tratamientos contra el cáncer e infecciones bacterianas. Algunos de estos resultados constituyen un punto de partida para futuros estudios *in vivo*.

# Conclusions

## CONCLUSIONS

In this thesis, biopolymeric nanoparticles have been successfully synthesized and their potential use as nanocarriers of anticancer or antibacterial drugs has been studied. These nanoparticles, depending on the nature of the biopolymer, the drug and its potential application specific type, have been characterized a) in terms of their drug loaded content, encapsulation efficiency and *in vitro* release of the drug, b) from the physicochemical point of view (size, zeta potential, morphology, chemical structure and thermal stability) and c) in terms of their bioactivity in tumor and healthy cells or bacterial strains.

Regarding the synthesis of silk fibroin nanoparticles loaded with anticancer drugs, the main findings are as follows:

1. The highest value of the Drug Loaded Content (21.82%) of the silk fibroin nanoparticles loaded with naringenin is reached with a NAR/SFN weight ratio of 1:1.
2. For the highest Drug Loaded Content value, silk fibroin nanoparticles loaded with naringenin have a hydrodynamic diameter of 180.1 nm and a zeta potential of -30.5 mV, values well suited for further application.
3. Silk fibroin nanoparticles loaded with naringenin show greater cytotoxicity than free naringenin in HeLa tumor cells, but less in EA.hy926.healthy cells.
4. Silk fibroin nanoparticles loaded with rosmarinic acid have a Drug Loaded Content of 9.4% and hydrodynamic diameter and zeta potential values of 255 nm and -17 mV, respectively.
5. Silk fibroin nanoparticles loaded with rosmarinic acid show higher cytotoxicity than free rosmarinic acid in HeLa and MCF-7 tumor cells.
6. Cell uptake assays show that silk fibroin nanoparticles loaded with rosmarinic acid have better uptake by cells than drug-free silk fibroin nanoparticles.
7. Studies on cell cycle and apoptosis/necrosis reveal that silk fibroin nanoparticles loaded with rosmarinic acid induce apoptosis in tumor cells in HeLa and MCF-7.
8. The ibrutinib-loaded silk fibroin nanoparticles have a Drug Loading Content value of 10.2% and hydrodynamic diameter and zeta potential values of 156 nm and -36 mV, respectively.
9. The optimal method for functionalizing silk fibroin nanoparticles with folic acid is by using polyethylenimine as linker between silk fibroin and folic acid.

10. Nanoparticles loaded with ibrutinib and functionalized with folic acid maintain a Drug Loaded Content of 10.2% and have hydrodynamic diameter and zeta potential values of 203 nm and 21.6 mV, respectively.
11. Treatment of HeLa, BT-474 and SKBR3 tumor cells with ibrutinib-loaded and folic acid-functionalized nanoparticles inhibits cell growth to a greater extent than ibrutinib-loaded but non-functionalized nanoparticles.
12. Nanoparticles loaded with ibrutinib and functionalized with folic acid do not significantly decrease the viability of healthy Ea.hy926 cells.
13. Cell uptake studies show greater internalization of ibrutinib-loaded and folic acid-functionalized nanoparticles compared to non-functionalized nanoparticles, suggesting that uptake is mediated by folate receptors, overexpressed on tumor cells.
14. When cancer cells are treated with nanoparticles loaded with ibrutinib and functionalized with folic acid, cell cycle arrest takes place in the G1 phase.
15. Apoptosis/necrosis assays reveal that cells undergo from apoptosis when treated with nanoparticles loaded with ibrutinib and functionalized with folic acid.

Regarding the synthesis of cellulose nanoparticles, the main findings are as follows:

1. The optimal conditions for the synthesis of cellulose nanoparticles are 200 mL of acetonitrile as antisolvent, 80 °C and 1 bar.
2. Cellulose nanoparticles have a hydrodynamic diameter and zeta potential of 233 nm and 28.5 mV, respectively.
3. Cellulose nanoparticles are not cytotoxic in HeLa cancer cells or in the healthy cell line Ea.hy926 in the nanoparticle concentration range studied.

Regarding the synthesis of antibacterial chitosan-gold nanoparticles, the main findings are as follows:

1. The size of chitosan-gold nanoparticles depends more on the concentration of chitosan than on its molecular weight.
2. A critical size of chitosan-gold nanoparticles above 150 nm and a zeta potential of around 50 mV are necessary to produce a significant antibacterial effect against the bacteria studied.

3. The results of the molecular simulation are in good agreement with the experimental antimicrobial activity of chitosan-gold nanoparticles, showing that the charge density is a critical parameter for such activity.

The results obtained in this Doctoral Thesis can be summarized stating that it has enlarged the knowledge on the synthesis and characterization of new nanostructures, contributing to the study and design of new treatments against cancer and bacterial infections. Some of these results constitute a starting point for future *in vivo* studies.

**ANEXO**  
**Materiales y Métodos de**  
**Cultivos celulares**

## **ANEXO. MATERIALES Y MÉTODOS DE CULTIVOS CELULARES**

Esta sección de materiales y métodos de cultivos celulares tiene como objetivo dilucidar los fundamentos científicos y técnicos que respaldan los experimentos realizados y la elección de los métodos de análisis utilizados. Proporciona una descripción detallada de los métodos y enfoques empleados, permitiendo una comprensión crítica de los resultados. Esta sección es crucial en ciencia, ya que garantiza la transparencia, la reproducibilidad y la validez de los resultados, facilitando la evaluación por parte de otros investigadores. Además, establece la credibilidad y el rigor científico de los ensayos realizados en la tesis, contribuyendo a la calidad del trabajo de investigación.

La sección se divide en cinco subapartados. El primero corresponde a una introducción a los cultivos celulares y el resto pertenecen a cuatro de los cinco capítulos de la tesis doctoral en los cuales se realizaron experimentos con distintas líneas celulares. Se proporcionará una descripción detallada de las líneas celulares utilizadas, los medios de cultivo empleados y las técnicas de análisis realizadas en cada uno de los capítulos. Esta información establecerá las bases científicas y técnicas necesarias para comprender y evaluar los resultados obtenidos en la tesis dentro del contexto de la biología celular.

### *1. Introducción a los cultivos celulares*

#### *1.1. Historia de los cultivos celulares*

El cultivo de tejidos ha evolucionado a lo largo de la historia superando dificultades gracias a los avances científicos y tecnológicos. A principios del siglo XX Ross Harrison y Leo Loeb realizaron los primeros cultivos de tejidos animales estableciendo así las bases para investigaciones *in vitro*. Otro de los pioneros de este campo fue Alexis Carrel que, junto a Montrose Burrows, lograron prolongar la vida de los cultivos mediante subcultivos y el uso de medios nutritivos adecuados. La contribución de Carrel al desarrollo del cultivo de tejidos fue enorme, tanto es así que en 1912 fue el primer estadounidense en recibir el Premio Nobel de Medicina. A partir de los años 40, con la llegada de los antibióticos, se hicieron avances significativos. Wilton Earle y su equipo aislaron células capaces de formar clones en el cultivo y demostraron la importancia de

los nutrientes para la división celular [2][3]. A lo largo de los años se habían hecho muchos intentos de cultivar células tumorales humanas, pero sin mucho éxito. Sin embargo, en 1951 se aislaron las primeras células tumorales humanas que crecieron en cultivo a partir de un carcinoma cervical de una joven afroamericana llamada Henrietta Lacks. Estas células fueron aisladas por George y Margaret Gey en el Hospital Universitario John Hopkins de Baltimore; se llamaron HeLa en honor a la donante [4]. En 1975, Milstein revolucionó el campo al establecer la producción de anticuerpos monoclonales [5]. En las décadas siguientes, se avanzó en la comprensión de los mecanismos de transformación celular y se desarrolló la biotecnología. En la década de 1990, la ingeniería de tejidos permitió la producción de cartílago [6]. En 2007, se logró reprogramar células adultas para convertirlas en células pluripotenciales inducidas, abriendo nuevas posibilidades en el campo del cultivo celular [7]. Todos estos hitos históricos evidencian cómo esta disciplina se ha convertido en una herramienta extremadamente valiosa en la investigación científica y médica.

### 1.2. ¿Por qué son interesantes los cultivos celulares?

Los cultivos celulares se utilizan como métodos alternativos a la experimentación *in vivo* en el desarrollo de nuevos fármacos y cosméticos, con el objetivo de obtener información equivalente a la obtenida con animales de experimentación sin utilizar directamente estos animales. Otros ejemplos de sistemas alternativos *in vitro* serían: utilizar animales inferiores (invertebrados), microorganismos, fracciones subcelulares, sistemas libres de células (pruebas bioquímicas) o el empleo de modelos matemáticos e informáticos (*in silico*). Estos métodos, también conocidos como métodos complementarios, podrían no sustituir directamente el uso de animales de experimentación, pero sí reducirlos. Según la directiva 86/609/CEE, los experimentos deben minimizar el número de animales utilizados y evitar causarles un daño innecesario, sufrimiento o estrés. Estos métodos alternativos deben seguir unos protocolos establecidos y validados por la “European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing“ (EURL). Deben ser protocolos que demuestren la aplicabilidad y fiabilidad de un nuevo método desarrollado para alcanzar un objetivo concreto que debe proporcionar resultados equivalentes o mejores que los del método original.

Los cultivos de tejidos son técnicas que permiten mantener en el laboratorio células, tejidos u órganos vivos separados del organismo multicelular del que forman parte. El objetivo principal de los ensayos *in vitro* es replicar las condiciones *in vivo* para que las células puedan sobrevivir, crecer y comportarse como en su entorno original. Esto se logra satisfaciendo sus necesidades físico-químicas, como el tipo de sustrato, temperatura y pH controlados, así como proporcionándoles nutrientes y protección contra agentes externos mediante técnicas de esterilidad y el uso de antibióticos. Entre los principales campos de aplicación de cultivos celulares destaca la bioquímica y biología molecular, la inmunología, la genética, la toxicología o la farmacología entre muchas otras.

Los modelos *in vitro* ofrecen varias ventajas en la investigación científica ya que permiten un mayor control de las condiciones experimentales, lo que resulta en una mayor precisión y comprensión de los resultados. Además, ofrecen información que es difícil de obtener en animales y facilitan el estudio de mecanismos de acción. También son más versátiles, ya que permiten realizar estudios dinámicos y metabólicos. Son más económicos y rápidos, ya que requieren instalaciones menos complejas y menos cantidad de productos. Además, reducen la variabilidad experimental al proporcionar poblaciones celulares más homogéneas y un entorno controlado. Desde el punto de vista ético, los modelos *in vitro* evitan el sufrimiento y estrés de los animales, lo que los hace más aceptables. También trabajan en una escala de  $\mu\text{g/mL}$ , lo que permite utilizar cantidades más pequeñas de sustancias.

Sin embargo, estos modelos también tienen limitaciones. Por ejemplo, no pueden evaluar aspectos como el comportamiento, el dolor o la irritación, relevantes en estudios *in vivo*. Tampoco pueden simular procesos fisiológicos de absorción, distribución y eliminación de sustancias, lo que puede afectar a la interpretación de los resultados. Por último, pueden tener dificultades para detectar efectos tóxicos retardados o crónicos a largo plazo.

En resumen, los modelos *in vitro* ofrecen muchas ventajas en términos de control, versatilidad, ética y economía, pero también presentan limitaciones en la evaluación de aspectos conductuales, procesos fisiológicos y efectos a largo plazo.

### 1.3. Tipos de cultivos celulares

Existen cuatro tipos de cultivos celulares en función de la naturaleza de las células que los compongan.

- Cultivo de órganos

En estos cultivos se busca lograr el crecimiento y mantenimiento de primordios de órganos, partes u órganos completos *in vitro*. Para ello se coloca el órgano extraído del animal de experimentación o paciente donante sobre una rejilla situada en un medio del que obtiene nutrientes y al que puede liberar desechos con el objetivo de preservar tanto la arquitectura como la función del órgano. Se mantiene la estructura y funciones de las células de manera organizada, en una situación que se asemeja a la observada en condiciones *in vivo*. Sin embargo, la proliferación celular es limitada a células de la periferia del órgano. Además, es necesario un nuevo explante para cada experimento lo que supone mucho trabajo y una limitada reproducibilidad de la muestra.

- Explantes primarios

Se coloca un fragmento de tejido o de órgano en un soporte de vidrio o plástico. Las células se adhieren a la superficie y las de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por el resto de la superficie del soporte.

- Cultivos histotípicos y organotípicos

Los cultivos histotípicos se caracterizan porque con un solo tipo celular se consigue alcanzar una elevada densidad celular, simulando un tejido. Los cultivos organotípicos constan de la combinación de varios tipos celulares que interaccionan entre sí pretendiendo simular la estructura tridimensional de un órgano. El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación *in vitro* de tejidos u órganos funcionales que puedan ser utilizados en injertos o trasplantes.

- Cultivo celular primario

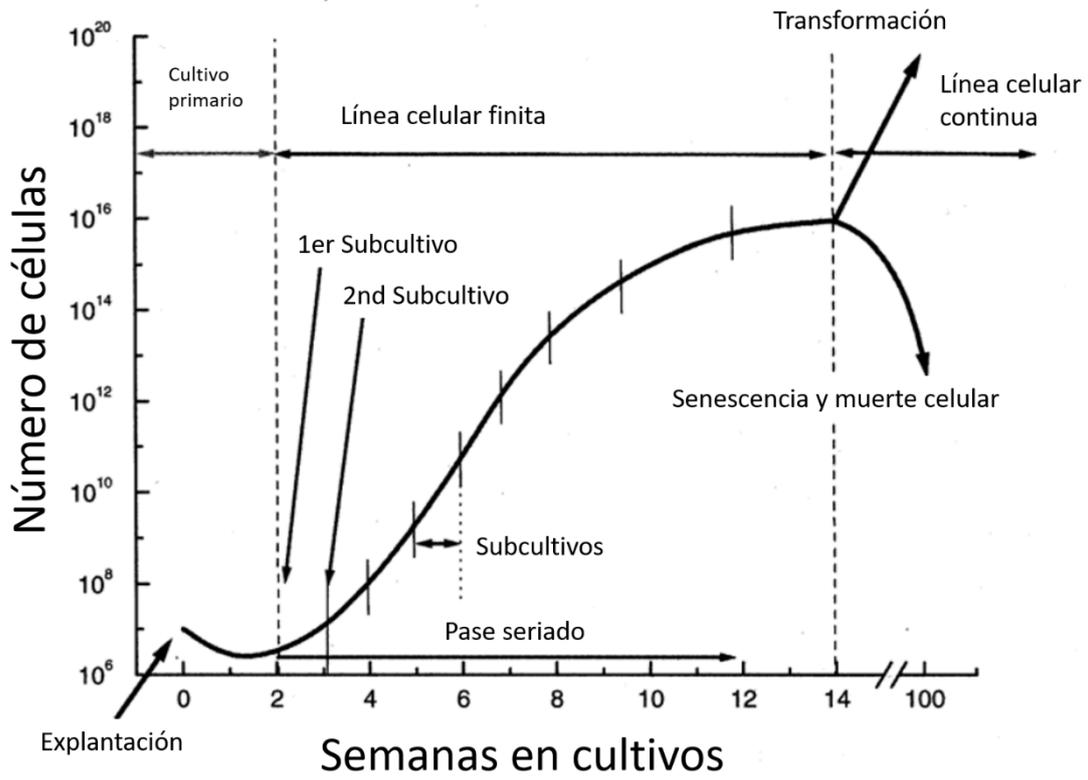
El cultivo celular es una técnica ampliamente utilizada que permite obtener células a partir de explantes primarios o suspensiones de células disgregadas mediante métodos enzimáticos o mecánicos. Estos cultivos se caracterizan principalmente por tener la capacidad de proliferar y aumentar así la población considerablemente. Una vez que las

células ocupan toda la superficie disponible, se alcanza la confluencia, lo que provoca que las células establezcan contactos entre sí, inhibiendo su proliferación y deteniendo su crecimiento. Por lo tanto, es necesario realizar subcultivos o pases periódicamente para trasplantar las células a un nuevo soporte y continuar así su crecimiento.

Existen dos tipos de cultivo celular primario. Los cultivos en monocapa donde las células crecen adheridas sobre un soporte de plástico o vidrio. Este anclaje es un requisito para su proliferación y el subcultivo se realiza por métodos enzimáticos. Los cultivos en suspensión, por su parte, se caracterizan porque las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje y se alcanza la confluencia cuando los nutrientes no son suficientes para el gran número de células que han crecido. Para subcultivarlas bastará con diluirlas con algo de medio de cultivo fresco.

Los sucesivos subcultivos y posterior proliferación de las células se conocen como líneas celulares. Por lo general, las líneas celulares tienen una vida finita que varía según el tipo de célula, prolongándose entre 20 y 100 generaciones. Después de alcanzar ese límite, las células entran en una etapa llamada senescencia, en la que pierden su capacidad de proliferación y finalmente mueren (presumiblemente debido al acortamiento de los telómeros). Sin embargo, algunas células, como las de roedores y las células tumorales, evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de manera espontánea, o de manera inducida mediante infección viral o transferencia de ADN. Este fenómeno es el resultado de cambios genotípicos conocidos como transformación. Este tipo de células se denominan inmortales porque crecen de manera indefinida y presentan un crecimiento aberrante ya que se pierde la inhibición por contacto y la limitación de la densidad celular durante la proliferación (Figura 1).

En esta tesis doctoral se han utilizado líneas celulares continuas.



**Figura 1.** Evolución de una línea celular [8].

## *2. Mejoras en la terapia contra el cáncer con nanopartículas de fibroína de seda cargadas con naringenina. (Capítulo 1. “Improving Anticancer Therapy with Naringenin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles”)*

### **Líneas celulares**

Con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de la naringenina (NAR), un fármaco anticancerígeno, se optó por utilizar células humanas de cáncer de cuello de útero (HeLa) debido a su facilidad de manejo en cultivos y su naturaleza cancerígena. Además, se utilizaron células humanas umbilicales (EA.hy926) para evaluar posibles efectos adversos del tratamiento. Ambas líneas celulares se adquirieron en la American Type Culture Collection (ATCC, EE.UU.).

### **Descongelación de células**

Se introduce el criotubo en un baño a 37°C hasta que se consigue mover la masa celular. Un criotubo es un recipiente cilíndrico en el que se encuentran las células congeladas. Posteriormente, esta masa celular se diluye en 10 mL de medio fresco en un tubo de centrífuga de 15 ml para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO) presente junto con las células y asegurar su supervivencia durante la descongelación. Tras centrifugar a 200g durante 10 min, el precipitado se resuspende en 2 mL de medio fresco. La fuerza g empleada en la centrífuga dependerá de las líneas celulares ya que, hay células con las membranas plasmáticas más frágiles que a 200g podrían romperse y morir.

Es esencial calcular la viabilidad de las células suspendidas después de la congelación y determinar la cantidad de células. Para ello, se prepara una mezcla de 100 µL de azul tripán y 100 µL de muestra (se puede disminuir la cantidad si no se tiene muestra suficiente, pero siempre manteniendo la relación 1:1). Se añaden 10 µL de esta muestra a la cámara de recuento automático o cámara de recuento manual Neubauer.

El azul tripán es un colorante que permite diferenciar entre células vivas y muertas. Las células vivas presentan una membrana celular intacta y no se colorean debido a que el

compuesto es excluido, sin embargo, la membrana celular de las células muertas es muy porosa y el compuesto la atraviesa con facilidad tiñéndolas de azul.

En función de la viabilidad celular, se decide el tipo de frasco de cultivo en el que se sembrarán las células. Existen diferentes tamaños de frascos disponibles, como los T25 para cultivos con baja viabilidad y los T75 para cultivos con alta viabilidad. Estos frascos tienen una superficie de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 2). En el caso de tener un número muy reducido de células viables, es preferible sembrarlas en frascos más pequeños para favorecer su crecimiento al promover la interacción entre ellas.



**Figura 2.** Imagen de los frascos de cultivos T75 y T25 para células adherentes.

El proceso de descongelación y adaptación de las líneas celulares a vivir en frascos de cultivo es muy dependiente de cada línea celular. En el caso de las HeLa, la adaptación puede tardar una semana, pero en el caso de las EA.hy926 tarda de entre 3 a 4 semanas.

Antes de empezar a hacer ensayos experimentales con cualquier línea celular, es necesario hacer un mínimo de 2 subcultivos para garantizar la adaptación de las células a la vida en el frasco.

### **Mantenimiento de líneas celulares**

Para que las células sean capaces de proliferar, es necesario utilizar medios de cultivo específicos que mantengan las constantes físico-químicas y aportes nutricionales necesarios. En este caso, se utilizó el medio “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) sin rojo fenol con un bajo contenido de glucosa (1 g/L). Este medio se complementó con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 1 mM de glutamax, un 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y 1 mM de piruvato. Las células se cultivaron a 37 °C bajo una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.

- El DMEM se utilizó por su alto contenido en aminoácidos esenciales y no esenciales para evitar así la suplementación de los mismos según los requerimientos específicos de las células.
- El rojo fenol se utiliza como indicador de pH en el medio de cultivo. Aunque es útil para detectar el estado de crecimiento de las células y posibles contaminaciones, también puede interferir con ciertas mediciones y afectar la morfología y función celular, así como empeorar la calidad de las imágenes, es por ello por lo que se prefirió utilizar medio sin este colorante.
- La cantidad de glucosa viene determinada por la rapidez del metabolismo celular.
- En este caso es imprescindible suplementar el medio con suero por su alto contenido en factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular (colágeno, laminina), proteínas transportadoras (albúmina), lípidos (fosfolípidos, colesterol), vitaminas, minerales, metabolitos y nutrientes (glucosa, aminoácidos) e inhibidores de proteasas (antitripsina) necesarios para el crecimiento y proliferación celular.
- La glutamina es un nutriente esencial para la síntesis de purinas, ARN, ADN y, por tanto, es un factor limitante del crecimiento. Además, es fuente de carbono y energía ya que su metabolización proporciona el 70% del ATP necesario para la supervivencia celular. Presenta un inconveniente, es inestable en soluciones acuosas, por ello se suelen utilizar glutaminas estabilizada como el glutamax. Si las condiciones de temperatura y pH no son las adecuadas, la glutamina se descompone en amonio reduciendo la viabilidad celular.
- Otros suplementos del medio de cultivo como los antibióticos se añaden como profilaxis para prevenir contaminaciones, pero no es recomendable su empleo rutinario porque pueden enmascarar posibles contaminaciones.
- El piruvato sódico se suele añadir a medios de cultivo celular como una fuente de carbono, además de la glucosa.
- Como se ha comentado anteriormente, la finalidad de los cultivos *in vitro* es asemejar las condiciones *in vivo*. Es por ello por lo que se elige cultivar las células a 37 °C .
- El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se emplea para regular el pH del medio de cultivo celular y crear un entorno que simule condiciones lo más realistas posibles para el desarrollo celular. Su función no es metabólica, sino actuar como un regulador del pH del medio. Su propósito es disolverse en el medio de cultivo, donde una

pequeña parte de él reacciona con el agua para formar ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). A su vez, este interactúa con el bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) presente en el medio, estableciendo un equilibrio iónico entre el ácido carbónico y el bicarbonato, los cuales son responsables de mantener el pH en el rango adecuado. En tejidos normales, se considera que el pH ideal se encuentra en el intervalo de 7.2 a 7.4.

Al tratarse de células adherentes, se subcultivaron utilizando una solución de 0,25% de tripsina-0,25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La tripsina es una proteasa encargada de desnaturalizar las proteínas que mantienen adheridas a las células en los frascos de cultivo. El EDTA es un quelante que se une a iones de calcio y magnesio, los cuales inhiben la actividad de la tripsina.

Cuando las células alcanzan la confluencia, se elimina el medio que contiene antitripsina y se añaden 2 mL de tripsina a 37 °C para favorecer la actividad enzimática durante 3 minutos aproximadamente (no exceder los 10 minutos de exposición a tripsina para evitar el daño de las membranas celulares o la muerte celular). Pasado este tiempo, se añade el doble de cantidad de medio completo para inactivar la actividad de la tripsina. Antes de volver a contar el número de células, es necesario centrifugar la muestra para que no queden restos de tripsina en el medio a la hora de subcultivar.

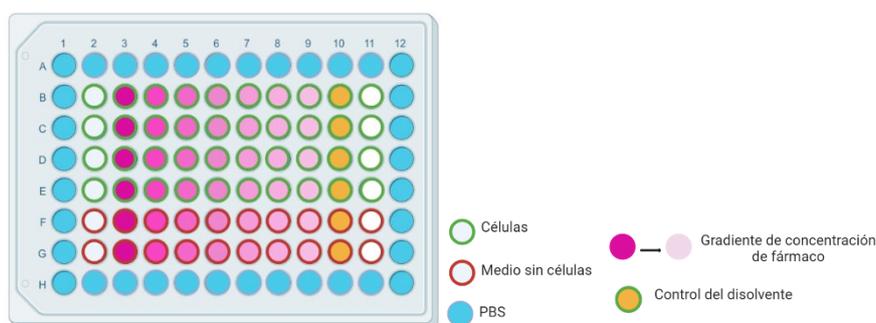
Es importante conocer cuánto crecen las células en cultivos para conocer la cantidad de células y elegir el tipo de frasco de cultivo adecuado y también para determinar el tiempo que tiene que transcurrir para volver a hacer un subcultivo, así como el número de veces que se debe cambiar el medio por semana. En este caso, ambas líneas celulares se subcultivaban cada lunes en T75 (las HeLa 3467 células/cm<sup>2</sup> y en el caso de las Ea.hy926 6666 células/cm<sup>2</sup>) y se les cambiaba el medio dos veces por semana.

### **Citotoxicidad *in vitro* - MTT**

Los ensayos de citotoxicidad se utilizan para evaluar posibles efectos tóxicos de una sustancia química comparando los cultivos tratados con los no tratados o control. Antes de realizar cualquier experimento de citotoxicidad es necesario determinar si la adición del fármaco al medio de cultivo provoca cambios en la osmolaridad celular. De ser así, el fármaco no estaría haciendo un daño directo a las células, sino que estaría modificando el medio de cultivo.

Se sembraron un total de  $5 \times 10^3$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C. Después de 24 h, el medio de cultivo de cada pocillo se sustituyó por medio fresco con diferentes concentraciones de NAR libre (0,39-50 µg/mL), SFNs (1,95-250 µg/mL) y NAR-SFNs (1,95-250 µg/mL), en cada experimento se utilizó como control células sin tratamiento (Figura 3). En este punto es importante conseguir una buena dispersión de las nanopartículas en el medio de cultivo sin perjudicar la esterilidad del medio, para ello se debe utilizar directamente la micropipeta o bien un baño de ultrasonidos.

La DLC de las NAR-SFNs se tuvo en cuenta para probar las nanopartículas cargadas y asegurar que la cantidad de NAR libre ensayada correspondía con la cantidad de NAR que había en las partículas.



**Figura 3.** Representación de una placa de 96 pocillos para ensayos de viabilidad celular.

Tras 48 h de incubación a 37 °C, se retiró el medio y se añadieron 200 µL de solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a una concentración final de 1 mg/mL y se dejaron en la oscuridad durante 4 h, tras lo cual se retiró el MTT y se añadieron 100 µL de DMSO. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas (Fluostar Omega) a 560 nm.

La sal de MTT es un compuesto de color amarillo que gracias a la acción metabólica de las células se reduce en un compuesto púrpura (formazán) con una absorbancia máxima a 570 nm. Este compuesto se acumula en forma de cristales insolubles cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo. Para solubilizar estos cristales se utiliza DMSO, entre otros disolventes. La cantidad de color generado dependerá de la concentración inicial de MTT, la duración del periodo de incubación y el número de células vivas.

La disolución de MTT se prepara añadiendo el soluto necesario (se pesa en una balanza de precisión y se requiere protección con mascarilla adecuada, así como protección de la

luz ya que el compuesto es tóxico y fotosensible) a medio de cultivo sin rojo fenol y sin FBS para evitar las posibles interacciones. Para asegurar que no queda ningún resto de MTT sin disolver, se hace pasar la disolución por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  como mínimo.

### **Test de Mycoplasma**

Se comprobó la ausencia de mycoplasma en todas las líneas celulares antes y después de los experimentos. Los Mycoplasmas son una forma simple de bacterias pertenecientes a la clase *Mollicutes*, que se caracterizan por no tener pared celular. Estos microorganismos tienen un genoma básico y funcionan como parásitos, aprovechando la maquinaria de las células huésped para obtener energía. Debido a su pequeño tamaño ( $\sim 100$  nm), los Mycoplasmas no son visibles a simple vista ni con un microscopio óptico, lo que les permite pasar desapercibidos durante largos períodos de tiempo. Además, al carecer de pared celular, son resistentes a la mayoría de los antibióticos, incluyendo la penicilina y la estreptomina. Esta contaminación puede tener un impacto significativo en las células y distorsionar los resultados a largo plazo por ello es crucial realizar este test de manera periódica.

Para llevar a cabo la prueba, es necesario sembrar las células en pocillos con una concentración de al menos 5000 células/mL. Si no se controla correctamente la confluencia celular, se pueden utilizar diferentes concentraciones en distintos pocillos (Figura 4). Es recomendable haber realizado al menos dos subcultivos sin antibióticos antes de realizar este test para evitar falsos negativos.

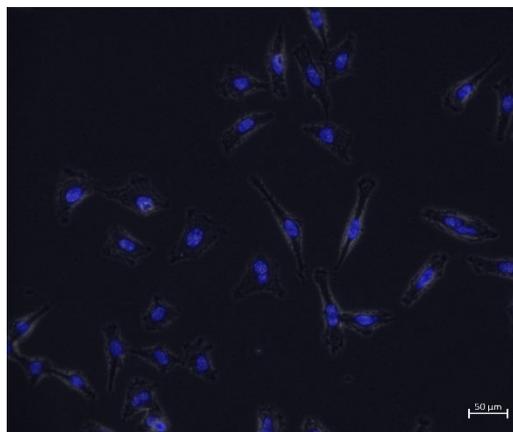


**Figura 4.** Imagen de un portaobjetos de cultivos celulares con cuatro cámaras de siembra.

Después de 24 h en incubación, se retira el medio de cultivo del pocillo y las células se fijan con una solución de fijador de Carnoy durante 5 minutos, tras retirar el fijador se agrega más fijador para una fijación adicional de 10 minutos. Luego, se retira el fijador y se deja que las células se sequen al aire. A continuación, se añade la solución colorante Hoechst 33258 y se deja actuar durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Después de retirar la solución colorante, se realiza un lavado con agua destilada y se deja que el

portaobjetos se seque al aire protegido de la luz. Finalmente, se observa el portaobjetos en un microscopio de fluorescencia. Los núcleos deben teñirse de azul y no se debe visualizar el citoplasma (Figura 5). Si el citoplasma aparece teñido, indica que hay contaminación en las células.

El fijador Carnoy es una mezcla de metanol absoluto y ácido acético glacial en una proporción de 3:1 v/v. Esta solución se debe preparar el mismo día de uso y debe desecharse en un contenedor especial. La solución colorante Hoechst 33258 se prepara a partir de una concentrada 10x y debe utilizarse en el momento de la tinción, en ausencia de luz y en condiciones de esterilidad.



**Figura 5.** Imagen de microscopía de fluorescencia de la línea celular HeLa tras realizarles el test de micoplasma. En azul se observa el ADN del núcleo teñido (20x).

### **Congelación de células**

Es importante disponer de alícuotas congeladas de células para evitar acumulación de cambios genéticos, senescencia y transformación en líneas celulares, así como la pérdida accidental de la línea celular por muerte o contaminación. El método más efectivo de almacenamiento es la congelación en nitrógeno líquido. Las bajas temperaturas afectan la difusión y ósmosis a través de las membranas y permite mantener la viabilidad y funcionalidad celular porque el frío enlentece las reacciones enzimáticas que se producen dentro de las células.

Para congelar las células es necesario que éstas hayan alcanzado la fase exponencial de crecimiento. Tras tripsinizar, neutralizar la tripsina con medio fresco y centrifugar para eliminarla, se debe contar el número de células y decidir la cantidad que se va a congelar. Es recomendable congelar alrededor de 2 millones de células por criotubo si hay

suficientes. La cantidad necesaria de células se separa y se vuelve a centrifugar para eliminar el medio de cultivo. Luego, las células se resuspenden en medio de congelación y se añaden rápidamente al criotubo y al Mister Frosty (Figura 6) donde permanecerán -80 °C durante al menos una semana, ya que la congelación debe realizarse gradualmente. Después de ese periodo, los criotubos se transfieren a nitrógeno líquido para su almacenamiento.



**Figura 6.** Imagen del recipiente de congelación Mister Frosty y un criotubo.

El medio de congelación está compuesto por FBS y un 10% de DMSO. El DMSO, es un solvente bipolar hidrosoluble de bajo peso molecular utilizado como crioprotector. La acción crioprotectora del DMSO se atribuye principalmente a su capacidad para prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, así como la formación de cristales de hielo que dañan la estructura de la membrana celular.

### *3. Actividad antitumoral de nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ácido rosmarínico en células HeLa y MCF-7 (Capítulo 2. “Antitumor Activity of Rosmarinic Acid-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles on HeLa and MCF-7 Cells”*

#### **Líneas celulares**

Con el objetivo de evaluar el comportamiento antitumoral del ácido rosmarínico (RA), además de la línea celular HeLa, se utilizaron células humanas de cáncer de mama (MCF-7).

#### **Mantenimiento de líneas celulares**

En cuanto a la obtención, mantenimiento y medios, se utilizaron los mismos descritos con anterioridad. Las MCF-7 se subcultivaron a una concentración de 9333 células/cm<sup>2</sup>. La peculiaridad de esta línea celular es que, el crecimiento en cultivo es tanto adherente como en suspensión. Cuando las células llegan a la confluencia, debido a su naturaleza metastásica, se despegan en agrupaciones de células y siguen viviendo en la superficie del medio. Hay que tener en cuenta estas consideraciones para trabajar con ellas.

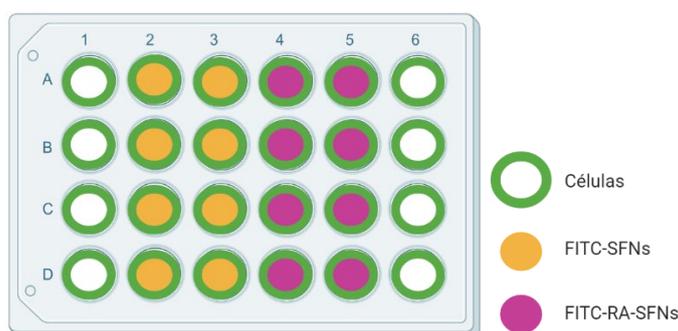
#### **Citotoxicidad *in vitro* - MTT**

Se realizó la misma experimentación descrita anteriormente. Pero, en este caso, al cambiar el tipo de fármaco, cambió también el contenido de carga de fármaco, DLC, y, en consecuencia, la cantidad de partículas añadidas. Las concentraciones finales de RA fueron 0,02, 0,041, 0,081, 0,65 y 1,3 mg/mL y de RA-SFNs fueron de 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2, 2,4, 3 y 3,5 mg/mL. En esta ocasión no se realizaron ensayos de viabilidad con las SFNs sin fármaco a distintas concentraciones, sino que se hizo un único experimento a una concentración de 3,5 mg/mL (la máxima) para evaluar si la viabilidad celular disminuía debido a la presencia de las SFNs sin fármaco.

#### **Internalización celular de las nanopartículas – Uptake assay**

En este ensayo se utilizó la técnica de citometría de flujo por primera vez. La citometría de flujo se basa en el diseño de un equipo llamado citómetro, que tiene dos propiedades fundamentales. En primer lugar, permite que las células pasen una por una a través de un estrecho hilo de líquido, y en segundo, hace que las células colisionen con uno o varios láseres. Cuando el láser choca con una célula, algunos fotones la atraviesan, mientras que otros son reflejados. Si la célula está marcada con un fluorocromo, los fotones chocan con él y emiten una luz de menor energía y mayor longitud de onda, lo que proporciona información sobre la presencia o ausencia del fluorocromo en la célula. En este caso, utilizamos isotiocianato de fluoresceína (FITC), como fluorocromo para cuantificarlo con el citómetro, por lo que las nanopartículas fueron marcadas con FITC.

Para determinar la captación celular de las FITC-SFNs y FITC-RA-SFNs se sembraron ambas líneas celulares en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h (Figura 7). Se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con FITC-SFNs y FITC-RA-SFNs a una concentración equivalente de RA de 0,224 mg/mL.



**Figura 7.** Representación de una placa de 24 pocillos sembrada para ensayos de internalización celular.

Para que este experimento se realice correctamente es imprescindible tener en cuenta que se debe sembrar una cantidad muy grande de células o, si las dimensiones del pocillo no lo permiten, juntar las siembras de varios pocillos sobre todo para las células control o sin tratar. Éstas son las que nos van a permitir localizar la población en el citómetro y evitar así cuantificar la autofluorescencia de las células sin fluoróforo provocada por productos del metabolismo.

El tiempo de exposición del fármaco a las células también será diferente en función de la velocidad para metabolizar las nanopartículas ya que, si a las 24 h está todo el tratamiento metabolizado, no veremos si las nanopartículas están dentro o no, porque todas las células habrán muerto.

El protocolo seguido consistió en retirar el medio de cultivo y agregar tripsina después de 24 horas de exposición de las células a los tratamientos. La tripsina se neutralizó con medio fresco y la suspensión se transfirió a tubos de citómetro previamente rotulados. Estos tubos se centrifugaron durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 2 mL de PBS a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó nuevamente durante 10 minutos. A continuación, se agregó una dilución al 4% de paraformaldehído (PFA) y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. El PFA se utiliza para fijar y preservar las células, dejándolas redondas e individualizadas. Se añadieron 2 mL de PBS y se centrifugó nuevamente. Por último, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS.

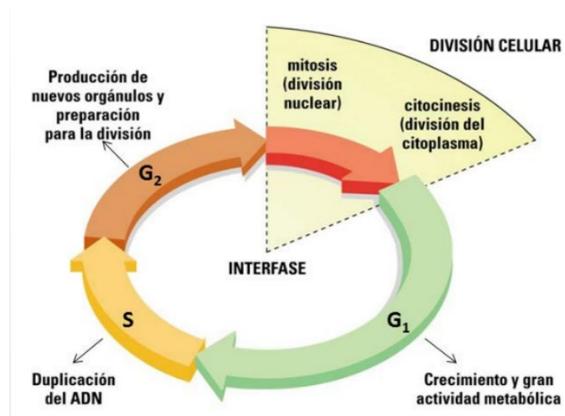
Estos tubos con las células en PBS se pueden almacenar en la nevera durante semanas, dependiendo del tiempo de vida del fluorocromo.

### **Estudio del ciclo celular**

El citómetro también se utiliza para cuantificar la cantidad de ADN que hay en cada célula pero, antes de explicar el procedimiento, es imprescindible conocer las diferentes fases del ciclo celular.

El ciclo celular representa los eventos que ocurren desde el momento en que una célula ha terminado de dividirse, hasta el momento en que vuelve a dividirse nuevamente. Este proceso se separa en dos grandes etapas, la interfase y la división celular. La interfase, se divide en tres fases, G1, S y G2. La fase G1 es la subetapa más larga de la interfase. Es una fase de crecimiento y diferenciación celular a la que le sigue una creciente actividad metabólica. En esta etapa se duplican los orgánulos celulares. En la fase S, la célula detiene su actividad normal y duplica su material genético. La fase G2 es la última subetapa y es la más breve de todas. En ella la célula se prepara para la división celular, corrigiendo posibles errores en la duplicación de ADN y sintetizando proteínas y otros elementos necesarios para la división. La división celular consta de dos subetapas: mitosis y citocinesis. La mitosis es la división del núcleo, donde el material genético se distribuye equitativamente en las dos células hijas. La citocinesis es la última subetapa, en la cual el citoplasma y los orgánulos celulares se dividen para formar dos células hijas (Figura 8).

El fluorocromo que detecta el citómetro y cuantifica es el yoduro de propidio (IP). Este compuesto es un intercalante de ADN capaz de unirse al ADN bicatenario de células cuya membrana plasmática no esté intacta o células muertas.



**Figura 8.** Fases del ciclo celular de las células eucariotas [9].

El protocolo que se siguió está basado en los pasos anteriormente descritos para el estudio de la internalización celular. Sin embargo, en esta ocasión, para evitar interacciones de los fluorocromos IP y FITC, las nanopartículas utilizadas no tenían FITC.

Tras tripsinizar, centrifugar, limpiar con PBS y volver a centrifugar, la dispersión de células se mantuvo durante 30 minutos en hielo con una disolución de 1 mL de PBS 30% -etanol 70% para fijar las células. En esta ocasión no se utilizó PFA, pero el efecto que produce en las células es el mismo. Este paso es imprescindible que se realice para este método ya que posteriormente se van a teñir las células con IP y se requiere que éstas estén muertas para que el IP penetre.

Por último, se eliminó el etanol por centrifugación. Las células se resuspendieron en 400  $\mu$ L de PBS y se añadieron 50  $\mu$ L de solución de RNasa y 50  $\mu$ L de PI a una concentración final de 0,1 mg/mL y 40 mg/mL, respectivamente, durante 30 minutos a 37°C para favorecer la actividad enzimática. La RNasa se añade para eliminar posibles restos de RNA que podrían quedar teñidos por el IP. Durante los 30 minutos es imprescindible agitar bien cada cierto tiempo la suspensión de células para así garantizar su total tinción.

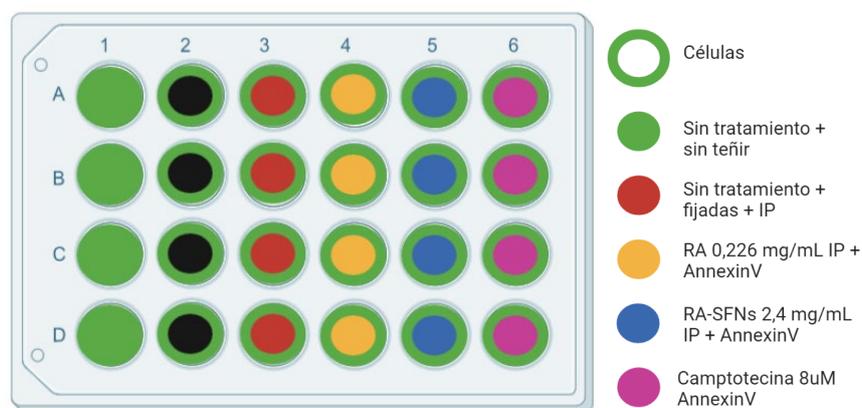
Para que este experimento se realice correctamente es imprescindible saber qué controles hay que preparar. Se necesita un número muy elevado (400.000) de células fijadas teñidas y sin tratamiento, para poder localizar la población.

Para poder analizar los datos correctamente con cualquier tipo de software de análisis, es importante recoger un mínimo de 20.000 eventos por cada tubo. Dependiendo de si las células tienden a agregarse más o menos, la obtención de los 20.000 eventos puede durar por cada tubo entre 3 y 45 minutos de análisis.

### Estudio de Apoptosis/Necrosis

Como el citómetro permite detectar la emisión o no de dos fluorocromos distintos simultáneamente, se puede analizar la apoptosis temprana al detectar la externalización de fosfatidilserina (PS) en células apoptóticas mediante la Annexina V recombinante conjugada con el colorante verde fluorescente FITC y las células muertas o necróticas mediante IP emitiendo fluorescencia roja.

Hay que tener muy claro los controles que se deben preparar antes de realizar el experimento, si falta alguno de ellos no serán válidos los resultados obtenidos. Se necesita control de células sin tratar y sin teñir, control de células teñidas con los dos colorantes sin tratamiento, control de camptotecina teñida y control de células sin tratar teñidas con IP (Figura 9).



**Figura 9.** representación de una placa de 24 pocillos sembrada para el estudio de la apoptosis/necrosis celular.

La metodología sigue el mismo patrón descrito anteriormente. Se siembran  $2 \times 10^5$  células en una placa de 24 pocillos durante 24 h. Se añaden las concentraciones de RA libre y RA-SFNs descritas anteriormente durante 24 h. Para el control positivo de apoptosis se utilizó una concentración de  $8 \mu\text{M}$  de camptotecina, un compuesto químico que induce la apoptosis celular. La concentración de este compuesto se debe establecer previamente mediante ensayos de citotoxicidad. Posteriormente, se tripsinizan, centrifugan y se lavan con PBS dos veces. A continuación, se debe proceder de forma distinta según el tipo de

muestra que se quiera analizar. Para las muestras problema, el control de camptotecina y el control de células sin tratar se añade 100  $\mu\text{L}$  del cóctel siguiendo el protocolo del kit que contiene IP y Annexin V. En este caso eran 20  $\mu\text{L}$  de Annexin V, 20  $\mu\text{L}$  de IP, 1 mL de tampón de incubación (HEPES 10 nM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM pH = 7,4). Tras 15 minutos de reposo en oscuridad, se añaden 200  $\mu\text{L}$  de PBS para poder medirlas en el citómetro. Sin embargo, para el control de IP será necesario fijar previamente las células y teñir con IP como se ha descrito anteriormente.

Todas las muestras a excepción del control de IP no se podrán guardar en la nevera porque durante el ensayo se las mantiene vivas.

Este experimento se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo FACScalibur de Becton-Dickinson, registrando la emisión a longitudes de onda de 620 y 525 nm para PI y Annexin V, respectivamente. En cada caso, se adquirieron 10.000 eventos.

### **Observación de la morfología celular**

Con este propósito se utiliza la microscopía invertida para capturar imágenes de las células después de los tratamientos con fármacos, con el objetivo de proporcionar una representación visual más clara de los resultados obtenidos. Esta técnica permite examinar de forma más detallada cualquier cambio morfológico sufrido por las células.

Para ello se sembraron  $6 \times 10^4$  células HeLa o MCF-7 en placas de 12 pocillos y, tras 24 h, se trataron las células con RA (0,113 y 0,226 mg/mL), RA-SFNs (1,2 y 2,4 mg/mL) y SFNs (2,4 mg/mL). Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Tras 48 h de tratamiento, las células se observaron y fotografiaron con un microscopio invertido de contraste de fase Zeiss Axio Observer 7.

#### *4. Nanopartículas de fibroína de seda cargadas con ibrutinib y funcionalizadas con ácido fólico para la terapia de células cancerígenas con sobreexpresión del receptor folato (Capítulo 3. “Folic Acid-Modified Ibrutinib-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Cell Therapy with Over-Expressed Folate Receptor”)*

##### **Líneas celulares**

Para este trabajo además de las líneas celulares HeLa y Ea.hy926, se utilizaron células humanas de carcinoma de mama (BT-474 y SKBR3) para estudiar el aumento de la internalización del fármaco Ibrutinib (IB) funcionalizado con ácido fólico (FA).

Estas líneas celulares, en concreto, se utilizaron porque el IB tiene la capacidad de matar células que sobreexpresan las proteínas HER2 y la EGFR ya que inhibe su fosforilación y, por tanto, su crecimiento celular. Las líneas celulares BT-474 y SKBR3 muestran una sobreexpresión de HER2, mientras que las células HeLa presentan una sobreexpresión de EGFR. Por otro lado, se ha observado que el receptor folato se encuentra sobreexpresado en todas las líneas celulares cancerígenas en mayor o menor medida, dependiendo del tipo celular, pero no se sobreexpresa en las células sanas.

##### **Mantenimiento de líneas celulares**

En cuanto a la obtención, mantenimiento y medios, se utilizaron los mismos descritos con anterioridad. Las BT-474 se subcultivaron a una concentración de 12000 células/cm<sup>2</sup> y las SKBR3 a 10666 células /cm<sup>2</sup>.

##### **Microscopía de fluorescencia invertida**

Para comprobar la unión de FITC y FA a las SFNs, las muestras de nanopartículas se pusieron en contacto con células en placas de cultivo celular. Se utilizaron las HeLa como células cancerígenas que sobreexpresan receptores folato y EA.hy926 como células sanas que no los sobreexpresan. Se sembraron en placas de 6 pocillos en una proporción de 15.600 células/cm<sup>2</sup> de medio de cultivo y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. A continuación, se retiró el medio y se añadió una dispersión de las SFNs funcionalizadas con FITC (del "Método 5" descrito en el Capítulo 3) y no funcionalizadas

a una concentración de 0,5 mg/mL. Las células se expusieron a las nanopartículas durante 3 y 6 h para poder evitar la metabolización de las partículas, y a continuación se tomaron fotografías con un aumento de 10x con un microscopio de fluorescencia invertido.

### **Citotoxicidad *in vitro* – Presto blue**

Los efectos citotóxicos de las IB-SFNs y las FA-IB-SFNs sobre las células se analizaron, esta vez, utilizando PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se trata de un compuesto a base de resazurina y es reducido a resorufina por las enzimas mitocondriales de las células. Esta reducción provoca un cambio de color y un desplazamiento en la fluorescencia del reactivo, lo que permite su cuantificación por fluorimetría o espectrofotometría. Esta preparación comercial se vende lista para usar y no es tóxica.

La metodología seguida fue la misma que la detallada anteriormente, salvo algunos cambios. Se sembraron células en placas de 96 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^3$  células/pocillo. 24 h después, se añadió medio fresco que contenía diferentes concentraciones de nanopartículas. Para los ensayos con células HeLa se utilizaron concentraciones de nanopartículas de entre  $3 \times 10^{-5}$  y 1 mg/mL. Para comparar el efecto citotóxico con el resto de líneas celulares, se utilizó en todos los casos una concentración de  $3,125 \times 10^{-2}$  mg/mL. Tras 48 h, se realizó un ensayo PrestoBlue siguiendo el protocolo del fabricante. La fluorescencia se midió utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Friburgo, Alemania) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los resultados de DLC de IB-SFNs se consideraron para probar las nanopartículas cargadas.

### **Ensayos de citometría de flujo**

Se siguió la metodología descrita anteriormente para los ensayos de internalización celular de las nanopartículas, ciclo celular y necrosis/apoptosis. Los únicos parámetros que cambiaron fueron el tipo de fármaco y las concentraciones utilizadas. Para el estudio de la internalización celular se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 12 pocillos y, tras 24 h se añadieron FITC-SFNs, FITC-IB-SFNs y FITC-FA-IB-SFNs a  $3,125 \times 10^{-2}$  mg/mL durante 24 h más. Para el estudio del ciclo celular se sembraron un total de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 12 pocillos durante 24 h a 37 °C. A continuación, se incubaron IB-SFNs y FA-IB-SFNs a  $3,125 \times 10^2$  mg/mL durante 48 h.

Para el ensayo apoptosis/necrosis se sembraron un total de  $2 \times 10^5$  células en una placa de 12 pocillos durante un periodo de 24 h. A continuación, se añadieron IB- SFNs, FA-IB-SFNs y sus correspondientes controles durante 24 h.

### Microscopía confocal

Para confirmar la captación celular de las nanopartículas, se realizaron imágenes de microscopía confocal de barrido láser en HeLa y EA.hy926. En esta ocasión solo se realizó el ensayo tras 6 h de exposición a FITC-SFNs, FITC-IB-SFNs y FITC-FA-IB-SFNs.

El protocolo que se siguió para obtener las imágenes consistía en sembrar 120000 células/pocillo en discos individuales tratados para células adherentes que facilitan su manejo en el microscopio (Figura 10). Tras 24 h se añadían las nanopartículas a 1,5 mg/ml y, tras 6h de exposición, se hacía el protocolo de tinción. En primer lugar, se retiraba el medio y se lavaban las células con PBS a 37 °C, este dato es muy importante a tener en cuenta porque si se lavan con PBS directamente procedente de la nevera podría inducirse muerte celular o cambios en su morfología debido al choque térmico. Después se fijan con PFA al 4% como se ha descrito anteriormente, tras 10 minutos se vuelven a limpiar con PBS atemperado y se añade el surfactante TritonX-100 al 0,5% en PBS durante 5 minutos para permeabilizar las células (las perfora, pero sin romperlas) para que puedan entrar los anticuerpos de la tinción celular. Después de volver a limpiar con PBS atemperado, se añade el volumen necesario para cubrir toda la superficie del pocillo de rodamina 100 nM durante 30 minutos en oscuridad. Se limpia la superficie 3 veces con PBS atemperado y se añade una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) previamente preparada a una concentración de 100 nM durante 30 segundos. Tras esto, se vuelve a limpiar con PBS y se guarda en una cámara húmeda, aislado y con un volumen suficiente de PBS en la nevera si el mismo día de la tinción no se van a hacer las fotos. Es preferible hacer las tinciones el mismo día de la foto para que los fluorocromos no pierdan intensidad.



**Figura 10.** Discos para microscopía confocal con la superficie tratada para células adherentes.

Lo que se pretende con este ensayo es localizar en el espacio celular las nanopartículas, para ello se tiñó con DAPI que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, coloreando el núcleo de las células de azul. La rodamina-faloidina (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, EE.UU.) es una sonda altamente específica para la actina F que se trata de una proteína filamentosa del protoplasma celular, encargada de conferir su forma a la célula, fijar las proteínas a la membrana y de participar en los movimientos celulares. Esta sonda se encuentra conjugada con el colorante fluorescente tetrametilrodamina (TRITC) de color rojo.

Finalmente, las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal de barrido láser invertido Leica STELLARIS 8, un láser blanco y un módulo FRET-FLIM.

5. *Síntesis de nanopartículas de celulosa partir de disoluciones en líquidos iónicos para aplicaciones biomédicas (Capítulo 4. “Synthesis of Cellulose Nanoparticles from Ionic Liquid Solutions for Biomedical Applications”)*

**Líneas celulares**

Para evaluar la biocompatibilidad de las nanopartículas de celulosa sintetizadas y descartar posibles efectos adversos se utilizaron las líneas celulares HeLa y EA.hy926.

**Citotoxicidad *in vitro* – Presto blue**

Se utilizaron las células HeLa y EA.hy926 siguiendo exactamente el mismo protocolo descrito en el apartado Citotoxicidad *in vitro* – Presto blue. En esta ocasión solo se evaluó la toxicidad de las nuevas nanopartículas de celulosa CNP-1F and CNP-2A para un rango de concentraciones entre 1-0.0078 mg/mL.

## REFERENCIAS

1. Carrel, A.; Burrows, M.T. Cultivation of Tissues in Vitro and Its Technique. *J. Exp. Med.* **1911**, *13*, 387–396, doi:10.1084/jem.13.3.387.
2. Sanford, K.K.; Merwin, R.M.; Hobbs, G.L.; Young, J.M.; Earle, W.R. Clonal Analysis of Variant Cell Lines Transformed to Malignant Cells in Tissue Culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **1959**, *23*, 1035–1059, doi:10.1093/jnci/23.5.1035.
3. EVANS, V.J.; SHANNON, J.E.J.; BRYANT, J.C.; WALTZ, H.K.; EARLE, W.R.; SANFORD, K.K. A Quantitative Study of the Effect of Certain Chemically Defined Media on the Proliferation in Vitro of Strain L Cells from the Mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* **1953**, *13*, 773–784.
4. Lucey, B.P.; Nelson-Rees, W.A.; Hutchins, G.M.; Henrietta, • Historical Perspective Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med—Vol HeLa Cells Cell Cult. Contam. al* **2009**, *133*.
5. Milstein, C. Monoclonal Antibodies. *Cancer* **1982**, *49*, 1953–1957, doi:10.1002/1097-0142(19820515)49:10<1953::aid-cnrcr2820491002>3.0.co;2-h.
6. Lysaght, M.J.; Reyes, J. The Growth of Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 485–493, doi:10.1089/107632701753213110.
7. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
8. Freshney, R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 4th Edition*; Sons, J.W. and, Ed.; 2000;
9. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Dereglulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149, doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

