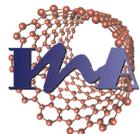




Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral

*Estudio del mecanismo molecular de apoptosis
y de la seguridad de la terapia fototérmica
aplicada al tratamiento del cáncer utilizando
nanoprismas de oro funcionalizados*

Memoria presentada por

Marta Pérez Hernández

Licenciada en Bioquímica

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Enero 2016

D. **Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Ciencias e investigador ARAID del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Dña. **Eva M^a Gálvez Buerba**, Doctora en Ciencias y Científica Titular del Instituto de Carboquímica del CSIC,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada " Estudio del mecanismo molecular de apoptosis y de la seguridad de la terapia fototérmica aplicada al tratamiento del cáncer utilizando nanoprismas de oro funcionalizados", ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, por Dña. **Marta Pérez Hernández**, bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones para que su autora pueda optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 6 de Octubre 2015

Fdo: Julián Pardo Jimeno

Fdo: Eva M^a Gálvez Buerba

Este trabajo ha sido realizado en la Universidad de Zaragoza, en la Facultad de Ciencias e Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), así como en el Instituto de Carboquímica (ICB) y en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Esta tesis se ha podido realizar gracias al interés y ayuda de mis directores de tesis Julián Pardo y Eva M. Gálvez que han conseguido financiación de donde no la había para subvencionarme y darme de comer estos años.

Agradecimientos

Ya ha llegado la hora de escribir esta parte, la más difícil y la que menos tengo ganas de escribir, ya que no deja de ser una despedida. Aunque por otro lado hay un montón de personas a las que quiero agradecerles su ayuda durante estos años, gracias a todos ellos la parte dura de hacer una tesis queda en el olvido.

Como no, tengo que empezar agradeciendo a mis directores de tesis **Julián** y **Eva** la oportunidad que me han dado de hacer esta tesis. No solo por abrirme las puertas a este mundillo y todo lo que me han enseñado, sino por hacer lo imposible por encontrarme financiación, tampoco ha sido fácil para ellos. A Julián por ser un jefe cercano que no se enfada nunca y al que se le puede hablar francamente y a Eva por tener siempre un hueco para mí, sin prisas y con la tranquilidad que necesitaba. Gracias también por vuestras vacaciones de verano y Navidad, con dos ejemplos así no cuesta nada hacer pequeños esfuerzos para sacar esto adelante, aunque supongan ir al laboratorio los domingos o festivos.

A los demás jefes-profesores del departamento, que fueron los que además de enseñar conocimientos, me hicieron interesarme por esta rama. A **Alberto**, que me guió al acabar la carrera y empezar el máster. A **Isabel Marzo**, por abrirme las puertas del laboratorio. A **Javier Naval** por sus conocimientos que no tienen fin y porque siempre es agradable encontrártelo por el pasillo. A **M^a Ángeles Álava**, que me orientó mucho durante la carrera. A **María Iturralde** y **Fermín** por su interés. A **Luis Martínez**, el mejor profesor de histología que puede haber, por su paciencia, cercanía y aclaraciones médicas. No te creas que te he reemplazado, aún tenemos un TUNEL pendiente.

A **Jesús M. de la Fuente**, por acogerme en su laboratorio aportando otro punto de vista del que he aprendido muchísimo. Y porque aunque tengas mil historias siempre has sacado un hueco para ayudar.

A **Marcelo de las Heras**, al que estoy infinitamente agradecida por su ayuda altruísta y todo lo que me ha enseñado. A **Sebastián Menao**, que sin su ayuda los análisis sanguíneos no hubieran sido posibles.

A **Marta Fajés**, a la que todos alaban por su efectividad, tanto que la parte del papeleo me ha parecido fácil. A los técnicos **Pili**, **Ismael** y **Mariví** por su trabajo, que es inmenso y también por estar ahí en los momentos de crisis ayudando ya sea con las manualidades, un aparato estropeado, buscando cosas o limpiando bacterias. Sin vosotros me habría entrado el pánico unas cuantas veces.

A **César** y **Javier Godino**, que han pasado a ocupar el papel de los anteriores en el CIBA, a quienes preguntas cuando no sabes cómo o qué hacer. Porque siempre que les busco es porque tengo algún problema o duda. Gracias por la ayuda en el traslado y adaptación, por el vacío, los programas de ordenador y vuestros conocimientos. A resto del CIBA, que en algún u otro momento se han cruzado en mi camino, ya sea por trabajo, en la cafetería o escalera. Entre todos me habéis ayudado a solucionar problemas, dudas o falta de material y hacéis que esto funcione bien. Especialmente a **María Royo** que me enseñó mis primeros conocimientos en microscopía y también en informática y gracias a la cual solicitar los servicios es más fácil. A las chicas de anatomía patológica **Marisa** y **Amparo**, con las que hemos experimentado, gracias por las cuchillas y los consejos, especialmete por enseñarme donde estaba el timo y como tallar los órganos. A los del submundo **Ana**, **Pilar**, **Susi**, **Silvia** y **Miguel** por hacer un poco más fácil el complicado trabajo bajo tierra. Gracias por intentar ayudar en lugar de poner trabas.

A los de **Lípidos**, **Mitocondrias**, **Vegetal**, y demás grupos del CIBA, los vecinos a los que pasas a pedirles sal cuando se te acaba y no te has dado cuenta, gracias por los incubadores, reactivos, vasos comunicantes y dejarnos algún congelador en algún momento crítico.

A mis compañeros de lab, que no me han podido tocar unos mejores. A los que estaban cuando llegué y entraron conmigo, no solo por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, si no por el gran compañerismo y el ambiente increíble que creasteis. Probablemente estos primeros años fueron una de las mejores etapas de mi vida, con la ilusión de lo nuevo y mínimas preocupaciones. A **las Patris**, a las que empecé a admirar desde el primer momento en que las ví, me parecía inalcanzable tanto conocimiento e independencia. A **Adri**, no tengo palabras para describirla, una de esas personas de las que no te olvidas nunca. Que además me enseñó la posibilidad de leer andando, una de las cosas más útiles en mi vida no-científica. A **Elena**, la persona con más paciencia que conozco y grandísima persona, no me pudo enseñar nadie mejor. Por todos esos momentos de los que sólo tengo buenos recuerdos ya sea en el lab, montañana o camino de casa. A **Laura**, que vale millones aunque no lo crea. Disfruta de los pequeños detalles y olvídate del resto. Aunque la vida parece un poco injusta, no necesitas suerte, al final todo llega cuando te lo ganas. A **Ariel**, con el que he abierto un poco más los ojos al mundo y he visto que las cosas pueden ser aún más complicadas. Te deseo lo mejor, cualquier día nos vemos. A **Dieguín**, por los almuerzos en condiciones y por su ayuda con todas las dudas de las NKs. A **Rubén**, mi aliado en el orden y reciclado, un gran compañero siempre dispuesto a ayudar. A **Natalia G.** por los buenos ratos, mira que conocemos gente peculiar. A **Diegón**, que lleva años acompañándome en este mundillo

desde esas clases de inmuno. Gracias por tu ayuda intelectual, "tu cuerpo" y los momentos bar.

Pero no solo tuve suerte con lo que me encontré, si no que con el paso del tiempo todos los que han entrado han mantenido el nivel de "buenrollismo" aunque la situación económica fuera empeorando, la presión fuera a más y las cosas ya no fueran de color de rosa. Por hacer de los cafés y el rato de la comida el mejor del día. A **Vidal**, que de hombre de hielo no tiene nada. A **Ana**, por sus barbacoas. A **Lourdes**, con la que se puede hablar durante horas y a **Oscar**, un artistazo de los pies a la cabeza, simplemente me encantas. Gracias a los dos por los momentos de desconexión y charradas que siempre me han dado ideas. A **David**, que se antepone a tus necesidades, mi suministrador de IPTG, por tus trucos y porque he aprendido muchísimo de tí, empezando porque las cosas no son lo que parecen y porque tu fuerza y empeño me ha dado fuerzas a mí. A **Sameer**, porque ha hecho todo lo posible por integrarse y por dejar que le enseñara español. A **Tania**, que me ha enseñado que todo es posible en la vida. A **Natalia peque**, por su risa contagiosa, gracias a la que cambié mis hábitos de desayuno. A los del CIBA, que me han ayudado muchísimo sobre todo en esta última etapa, permitiéndome centrarme un poco más en la escritura y perder menos tiempo en ir y venir, por todos y cada uno de los detalles desde solicitudes por internet a cambio de células, gracias. Gracias también por escucharme en los momentos desahogo, a veces solo con contar las cosas uno se siente mejor. A **Llipsy**, por su compañía los domingos en el agujero ese y porque aunque sea madre siempre está dispuesta a ir al lab a deshora. A **Maykel**, porque no se lo que hubiéramos hecho sin él en Montañana, le ha echado más horas que todos los demás juntos, desde aquí mi reconocimiento y gratitud. Admiro lo bien que os organizáis los dos. A **Paula** y **Laura Comas** por sus bailes que dan ganas de seguir las aunque no me motive nada esa música, no perdáis nunca la ilusión. A **Pilar**, por su disposición y porque lo tiene todo organizado. A **Santi**, del que me sorprende su edad, interés y actitud, te irá bien en la vida.

Al trabajar en tantos sitios tienes la ventaja de conocer gente maravillosa pero los agradecimientos se alargan. Al pasar por carboquímica tengo que agradecer a **Pilar** su ayuda con experimentos y por el viaje a Taiwan que nunca olvidaré, a pesar de no conocernos de nada no podía haber sido una compañía mejor. A todos y cada uno de los del **INA**, por hacerme un huequecito en la poyata o en el despacho, por vuestra ayuda con los aparatos y encontrando las cosas y por no mirarme mal cuando os he tenido horas a oscuras. Especialmente a los que han participado directamente en este proyecto, **Bea** y **Valeria** en los primeros momentos del proyecto, **Pablo** que me transmitió su emoción y las ganas de hacer cosas, **Gabi** y **Álvaro**, por dejarse robar unas pocas nanos. A **Scott**, al que estoy infinitamente agradecida, sin él que no hubiera podido terminar la tesis. No solo por las nanos y el láser si no

porque siempre está dispuesto a ayudar en lo que sea, si encuentro trabajo, o mejor dicho, cuando lo encuentre, será gracias a tí. Siento haber sido tu gran marrón. A **María y Grazyna**, por su gran ayuda con todo lo relacionado con los ratones, me ha encantado compartir experimentos con vosotras y haberos conocido, porque en compañía las horas pasan más rápido. Sois geniales, he aprendido mucho de vosotras y os echaré de menos.

A **Noe, Kake y David**, por ponerme los pies en la tierra. Porque por ellos, merece la pena continuar con esto, aunque sea una vida dura, poco agradecida y nada estable.

A esa **familia cuatrinera**, por los fines de semana de desconexión total de los que vuelves con el cuerpo hecho polvo pero con las pilas nuevas, gracias a los que he mantenido la cordura estos años.

He tenido suerte dos veces, la primera con la familia que me tocó que es la que hubiera elegido. Porque siempre están ahí y porque gracias a ellos soy como soy. Gracias a tíos, primos y abuelos, porque todos se han preocupado siempre por mí y se han alegrado de mis progresos. Especialmente tengo que nombrar a mis tíos **Manolo** y **Mª Carmen** (que ha sido una segunda madre para mí pero en tía) porque siempre me han ayudado y cuidado. Gracias por mi primer coche, con el que además aprendí mecánica. Aquí tengo que nombrar a **Carlos**, que ha contribuido al mantenimiento de los siguientes. A **Cris**, la persona más valiente que conozco, porque el tiempo que estuvo aquí me cuidó cuando tenía que haber cuidado yo de ella. A **Marcos**, que lo quiero con locura y a mis **padres**, por su apoyo incondicional, porque nunca me ha faltado nada y su sacrificio ha ido más allá del que se espera de unos padres sin exigirme nunca nada a cambio. Gracias por permitirme hacer lo que quiero, nunca os podré devolver todo lo que me habéis dado. Esta tesis es vuestra.

La segunda vez que tuve suerte fue con la familia política que me tocó, **Antonio, Mila y Eva**, por su apoyo aún sin comprender de que va este mundo. Porque con ellos me siento como en mi casa.

A **Héctor**, aquí está nuestro resultado. Porque no solo me has apoyado, sino que has participado de forma directa en esta tesis, haciendo de seguro de vida y compañía en festivales. Porque incluso has estado dispuesto a leerte todo el coñazo que viene a continuación. Gracias por ponerme las cosas tan fáciles, por organizar tus fines de semana según mis turnos en el animalario, por no quejarte del ambientador que dejaba en el coche cada vez que lo cogía, por traerme la comida los días de autofagia, porque sin tí no hubiera sido posible. No se lo que viene a continuación, pero me da igual mientras sea contigo.

Abreviaturas

ABB: tampón de unión de la anexina-V ("Annexin Binding Buffer")

AIF: factor inductor de apoptosis ("Apoptosis Induction Factor")

AnnV: anexina-V

Apaf-1: factor inductor de apoptosis ("apoptosis protease activating factor 1")

APC: "Allophycocyanin" ($\lambda_{\text{abs}}=652 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=658 \text{ nm}$)

AuNPs: nanopartículas de oro

AuNPRs: nanoprismas de oro

CTL: linfocito T citotóxico o CD8+ ("Cytotoxic T Lymphocyte")

CARD: dominio de reclutamiento de caspasas ("Caspases Recruitment Domain")

CrmA: del inglés "Cytokine response modifier A"

DAMPS: del inglés, "Danger/Damage Associated Molecular Patterns"

DD: dominio de muerte ("Death Domain")

DED: Dominio efector de muerte ("Death Effector Domain")

DEVD: Péptido Asp-Glu-Val-Asp

DISC: complejo señalizador inductor de muerte ("Death-Inducing Signaling Complex")

EndoG: Endonucleasa G

FADD: del inglés, "Fas associated death domain"

FITC: "Fluorescein Isothiocyanate" ($\lambda_{\text{abs}}=495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=519 \text{ nm}$)

fmk: fluorometilcetona

GM-CSF: "granulocyte-macrophage colony stimulating factor"

gzm: granzima

h: horas

HS: Suero de caballo ("Horse Serum")

IAPs: Inhibidor de proteínas apoptóticas

ICP-MS: del inglés, "inductively coupled plasma mass spectrometry"

IETD: Péptido Ile-Glu-Thr-Asp

INF- γ : Interferón γ

KO: del inglés, "Knock out"

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

min: minutos

MNP(s): nanopartícula(s) magnéticas

MOMP: Poro en la membrana externa mitocondrial formado por la oligomerización de Bak y Bax ("Mitochondrial Outer-Membrane Pore")

NK: Célula asesina natural ("Natural Killer")

NP(s): Nanopartícula(s)

NPR: Nanoprismas de oro recubiertos con PEG

NPR-G: Nanoprismas de oro que además de PEG presentan Glucosa

NPR-T: Nanoprismas de oro que además de PEG presentan el fluoróforo tamra

NPR-TG: Nanoprismas de oro que además de PEG presentan glucosa y tamra

NPR-AG: Nanoprismas de oro que además de PEG presentan glucosa y el fluoróforo Alexa-647

PBS: Tampón fosfato ("Phosphate Buffered Saline")

PEG: polietilenglicol. Polímero sintético no degradable

PGA: ácido poliglutámico ("Polyglutamic Acid"). Polímero sintético degradable

PS: fosfatidilserina ("Phosphatidilserine")

PTP: Poro transitorio en la membrana mitocondrial "Permeability transition pore"

RE: retículo endoplásmico

ROS: especies reactivas de oxígeno ("Reactive Oxygen species")

seg: segundos

SFB: Suero Fetal Bovino

TCR: Receptor de antígeno de células T ("T-cell Receptor")

TNF: factor de necrosis tumoral ("Tumor Necrosis Factor")

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral ("Tumor Necrosis Factor Receptor")

TRADD: del inglés "TNF receptor associated death domain"

z-VAD: péptido Val-Ala-Asp inhibidor general de caspasas.

wt: fenotipo silvestre ("Wild type")

7AAD: sonda fluorescente ($\lambda_{abs}=488-518\text{nm}$, $\lambda_{em}=647\text{ nm}$) "7-Aminoactinomycin D"

2HE: 2-hidroxietidio ($\lambda_{abs}=518\text{nm}$, $\lambda_{em}=606\text{ nm}$)

Índice

Capítulo 1: Antecedentes y Objetivos	1
1.1. Estudio del mecanismo de apoptosis en terapia fototérmica utilizando AuNPRs .	3
1.2. Estudio de la seguridad del uso de AuNPRs.....	3
1.2.1. Estudio de la toxicidad de AuNPRs <i>in vitro</i>	3
1.2.2. Estudio del efecto de AuNPRs sobre la actividad de células NK	4
1.2.3. Estudio de biodistribución y toxicidad de AuNPRs <i>in vivo</i>	4
Capítulo 2: Introducción	5
2.1. Muerte Celular	7
2.1.1. Apoptosis	7
2.1.1.1. Moléculas implicadas en la apoptosis.....	8
2.1.1.1.1 Caspasas.....	9
Activación de las caspasas.....	10
Sustratos de las caspasas	11
Regulación de las caspasas	12
2.1.1.1.2. Proteínas de la familia Bcl2	13
2.1.1.2. Mecanismos de apoptosis	16
2.1.1.2.1. Vía intrínseca o mitocondrial.....	16
2.1.1.2.2. Vía de los receptores mortales	19
2.1.1.2.3. Vía de los gránulos citotóxicos	22
2.1.2. Necrosis	26
2.1.3. Autofagia.....	27
2.1.4. Piroptosis	29
2.2. Nanotecnología... ..	31
2.2.1. Relevancia de los nanomateriales.....	31
2.2.2. Descripción de las nanopartículas (NPs).....	33
2.2.3. Nanopartículas en medicina: Nanomedicina.....	34
2.2.3.1. Nanopartículas para el diagnóstico: Nanodiagnóstico.....	35
2.2.3.2. Nanopartículas en la terapia: Nanoterapia.....	35
2.2.4. Tipos de nanopartículas	36
2.2.4.1. Nanopartículas poliméricas.....	36
2.2.4.2. Liposomas	37
2.2.4.3. Nanotubos de carbono	37
2.2.4.4. Quantum dots (QDs).....	38
2.2.4.5. Nanopartículas magnéticas (MNPs).....	38
2.2.4.6. Nanopartículas de oro (AuNPs)	39
2.2.5. Estructura de las NPs inorgánicas.....	39

2.2.6. Nanopartículas de oro (AuNPs).....	40
2.2.6.1. Propiedades ópticas	41
2.2.6.2. Síntesis de AuNPs.....	43
2.2.6.2.1. Métodos físicos.....	43
2.2.6.2.2. Transformación química	44
2.2.6.3. Funcionalización.....	45
2.2.7. Toxicidad.....	46
2.2.8. Hipertermia como tratamiento para el cáncer	49
Capítulo 3: Materiales y Métodos	53
3.1 Cultivos celulares.....	55
3.1.1 Líneas celulares	55
3.1.2 Mantenimiento de los cultivos celulares	56
3.1.3 Contaje y determinación de la viabilidad celular	56
3.1.4 Congelación y descongelación de líneas celulares.....	57
3.1.5 Inactivación del complemento del suero.....	57
3.1.6 Determinación de la presencia de micoplasmas.....	58
3.1.6.1 PCR.....	58
3.1.6.2 Luminiscencia.....	59
3.1.7 Eliminación de micoplasmas	59
3.1.8 Inmortalización de células primarias 3T9.....	60
3.1.9 Obtención de medio condicionado	60
3.2 Obtención de macrófagos a partir de médula ósea de ratón.....	60
3.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	61
3.4 Síntesis y funcionalización de nanoprismas de Oro	62
3.4.1 Síntesis	62
3.4.2 Funcionalización.....	62
3.5 Citotoxicidad y entrada en la célula de AuNPRs.....	63
3.6 Activación de NKs.....	64
3.7 Separación de poblaciones celulares mediante MACS (separación celular basada en campos magnéticos).	64
3.8 Marcaje de las células con sondas fluorescentes	65
3.9 Citotoxicidad mediada por células NK.....	65
3.10 Análisis de proteínas	66
3.10.1 Análisis de proteínas por Western-Blot.....	66
3.10.1.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares con	
detergentes.....	66

3.10.1.2	Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.	67
3.10.1.3	Transferencia de proteínas a membranas.....	67
3.10.1.4	Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting).	67
3.10.2	Análisis de proteínas mediante tinción con Azul de Coomasie	69
3.10.3	Análisis de proteínas por citometría de flujo.	69
3.10.3.1	Análisis de proteínas de superficie	70
3.10.3.2	Análisis de proteínas intracelulares	71
3.11	Análisis de la muerte celular por citometría de flujo	72
3.11.1	Análisis de traslocación de fosfatidilserina y la permeabilización de la membrana celular	72
3.11.2	Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	73
3.11.3	Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	73
3.11.4	Análisis de la activación de la caspasa 3.....	73
3.12	Ensayo clonogénico.....	74
3.13	Test de proliferación celular de Mossman (MTT)	74
3.14	Láser para irradiación NIR	75
3.15	Microscopía de fluorescencia confocal	75
3.16	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	76
3.17	Determinación de oro por ICP-MS	76
3.18	Cuantificación del TAMRA en los nanoprismas por fluorimetría.....	77
3.19	Toxicidad y biodistribución de NPs <i>in vivo</i>	77
3.19.1	Concentración de NPs.....	78
3.19.2	Modelo animal.....	78
3.19.3	Toma de muestras	78
	Capítulo 4: Resultados	81
4.1	Nanoprismas de oro (NPRs)	83
4.1.1	Funcionalización de los NPRs.....	83
4.2	Estudio del uso de AuNPRs para terapia fototérmica (PTT).	85
4.2.1	Estudio del tipo de muerte celular inducida por PTT.....	86
4.2.2	Mecanismo molecular de muerte celular inducida por PTT	89
4.2.3	Papel de los lisosomas en el mecanismo de apoptosis inducida por PTT con AuNPs.....	93
4.2.4	Papel de las catepsinas en el mecanismo de apoptosis inducida por PTT con AuNPRs	97
4.2.5	Discusión.....	100
4.3	Toxicidad <i>in vitro</i>	105

4.3.1	Internalización de los nanoprismas en la célula.....	106
4.3.2	Cambios en la morfología celular	109
4.3.3	Generación de radicales libres de oxígeno (ROS).....	110
4.3.4	Caída de Potencial mitocondrial	112
4.3.5	Muerte Celular.....	113
4.3.6	Ensayo clonogénico	115
4.3.7	Toxicidad en células primarias	117
4.3.8	Discusión.....	120
4.4	Efecto de los AuNPRs en la activación de células NK	123
4.4.1	Introducción al sistema inmune. Células NK.....	123
4.4.2	Efecto de los NPR-G en la actividad citotóxica de células NK.....	125
4.4.3	Discusión.....	130
4.5	Toxicidad y biodistribución de los AuNPRs <i>in vivo</i>	133
4.5.1	Biodistribución de AuNPRs	133
4.5.1.1.	Biodistribución de AuNPRs a los 3 días de su administración	133
4.5.1.2.	Biodistribución de los AuNPRs tras 4 meses de su administración.....	135
4.5.2	Toxicidad de NPR-TG	139
4.5.2.1.	Toxicidad aguda de los AuNPRs	139
4.5.2.2.	Toxicidad crónica de los AuNPRs.....	142
4.5.3	Discusión.....	147
Capítulo 5: Discusión general.....		153
Capítulo 6: Conclusiones		153
Bibliografía.....		161

Capítulo 1

Antecedentes y
Objetivos

El efecto fototérmico consiste en la habilidad que presentan los materiales plasmónicos en transformar la luz absorbida en calor. Esta respuesta fototérmica se ha explorado durante muchos años para su uso en varias aplicaciones incluidas la terapia fototérmica [1], liberación de drogas [2, 3], imagen [4, 5] o biosensores [6].

En las últimas 2 décadas, el número de trabajos sobre las aplicaciones de los materiales plasmónicos se ha visto aumentado, particularmente debido al desarrollo de nuevos materiales y el tratamiento contra el cáncer [7]. El uso de nanopartículas (NPs) en medicina, utilizando sus propiedades fisico-químicas y la posibilidad de funcionalizarlas con distintas moléculas [8], mejora la sensibilidad de las técnicas actuales de imagen y diagnóstico y la especificidad de las terapias [9, 10]. La nanomedicina pretende solucionar algunos de los problemas por los que se han descartado el uso de determinadas drogas, como por ejemplo, solubilidad, tiempo de vida en el organismo o conseguir altas concentraciones.

En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan unas ventajas adicionales respecto a otros metales. La primera es que las propiedades ópticas de las AuNPs pueden localizarse en el infrarrojo cercano (NIR), en lo que se conoce como ventana biológica, donde la absorción de los componentes biológicos es limitada [11]. Segundo, en contraste con otros metales como plata o cobre, el oro es más noble y se considera uno de los más seguros y estables [12]. Por último, la cantidad y facilidad de métodos sintéticos permiten la síntesis de AuNPs con objetivos específicos simplemente variando la forma, tamaño y superficie [13].

La terapia fototérmica (PTT) abarca la localización de las NPs en el tumor seguida de una irradiación que produce un aumento de temperatura local que mata la célula [14]. Un número limitado de trabajos han propuesto la apoptosis como mecanismo de inducción de muerte durante la terapia fototérmica utilizando diferentes tipos de NPs [15-17]. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no explora en detalle si realmente la muerte celular se produce por apoptosis. De hecho, la necrosis sigue siendo el mecanismo mayoritario de muerte celular durante la ablación tumoral [18]. La necrosis supone la liberación de componentes celulares al medio extracelular, lo que supone la inducción de una respuesta inflamatoria que puede dañar el tejido adyacente, incluso favorecer el crecimiento y la resistencia tumoral [19]. Mientras que la apoptosis se caracteriza por la preservación de la membrana plasmática y la aparición de señales de fagocitosis en las células que se mueren, lo que hace que sean rápidamente eliminadas por macrófagos y células dendríticas, lo que además de evitar las consecuencias indeseadas de la necrosis, puede activar la inmunidad antitumoral [20, 21].

Como respuesta de un estímulo externo, tanto la apoptosis como la necrosis pueden ocurrir de forma independiente, secuencial y simultánea [22]. De hecho, la respuesta celular a materiales plasmónicos es compleja y depende de la cantidad de NPs internalizadas, así como de la cantidad de energía absorbida [11]. Las propiedades de los materiales plasmónicos pueden ser moduladas cambiando el tamaño, la forma y composición. La internalización de las NPs por parte de la célula puede ser incrementada con moléculas específicas como péptidos [23], carbohidratos [24] o proteínas [25], lo que mejora la selectividad y permite reducir las dosis de irradiación. Un reto en este área es ajustar la excitación óptica para inducir apoptosis de modo específico en determinadas áreas.

Por otro lado, los materiales utilizados para bioaplicaciones deben preservar sus características fisicoquímicas en condiciones biológicas, además no deben afectar a la función de componentes biológicos como células y proteínas. La nanotoxicología es un área que crece rápidamente, la cual investiga las interacciones de las NPs con componentes biológicos [26, 27]. Las propiedades fisicoquímicas de las NPs que incluyen la composición, tamaño, forma, etc, influyen en su toxicidad [13]. La respuesta celular más común es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden ser toleradas hasta ciertos niveles sin efectos secundarios, lo que depende del tipo celular [28, 29]. Además, la alteración de la homeostasis celular debido a la acumulación masiva de NPs dentro de la célula o la interacción con rutas de señalización puede llevar a multitud de efectos adversos [30].

La terapia fototérmica utilizando AuNPs ya se encuentra en estudios clínicos (AuroLase® Therapy) [1], sin embargo el impacto de estas NPs en cultivos celulares no se ha investigado ni caracterizado en detalle.

Recientemente, en el grupo de investigación se ha desarrollado un método sintético que permite la producción de AuNPs con forma de prisma (AuNPRs) en ausencia de agentes tóxicos [31]. Estos AuNPRs se pueden funcionalizar con moléculas como la glucosa que permiten su internalización en las células, absorben en el NIR (1064 nm) y ya se ha demostrado su eficiencia en la generación de calor para la ablación de las células *in vitro* [31], tomografía optoacústica [4] o biosensores [32].

El **objetivo principal** de esta tesis ha sido el uso de estos AuNPRs para de forma eficiente y selectiva inducir apoptosis en células tumorales y más importante, descifrar el mecanismo de muerte celular que se desencadena, para poder predecir la eficacia de este nuevo tratamiento contra células tumorales que son resistentes a las terapias convencionales. Todo ello junto con un estudio en detalle de su toxicidad, para poder prevenir y minimizar sus efectos adversos.

A continuación se describen los objetivos intermedios de este trabajo.

1.1 Estudio del mecanismo de apoptosis en terapia fototérmica utilizando AuNPRs

La mayoría de los estudios de fototermia analizan, con distintas condiciones y diferentes tipos de NPs, si son capaces de matar células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* [33, 34]. Sin embargo, nosotros consideramos que no solo es importante la eliminación de las células tumorales, sino también cómo se eliminan, ya que esto puede tener consecuencias para el organismo. Por lo que no solo nos planteamos utilizar estos nanoprismas para matar células, si no también modular las condiciones para que la muerte sea por apoptosis. Para ello incubamos células MEF con AuNPRs con glucosa (para favorecer su internalización) y los irradiamos a 1064nm.

Una vez conseguidas las condiciones para inducir apoptosis, nos propusimos estudiar cual es el mecanismo molecular que se desencadena, ya que muchos tumores han desarrollado resistencias para evadir la apoptosis [35], lo que dificulta su tratamiento con terapias convencionales. Por lo que conocer el mecanismo de muerte es importante para predecir la efectividad en el tratamiento de células resistentes. Para llevar a cabo dicho estudio se utilizaron líneas celulares (MEF) que carecen de diferentes moléculas que intervienen en la apoptosis.

1.2 Estudio de la seguridad del uso de AuNPRs

Como ya se ha nombrado anteriormente, el uso de NPs lleva inherente una serie de efectos secundarios debidos a sus características como nanomaterial, que les permiten interactuar con componentes biológicos [36]. Todo nanomaterial que se desarrolle para aplicaciones biomédicas antes de que pase a clínica, es necesario su estudio toxicológico en detalle, para prevenir posibles efectos adversos [37]. Por lo que nos planteamos el estudio de la toxicidad de estos AuNPRs tanto *in vitro* como *in vivo*

1.2.1 Estudio de la toxicidad de AuNPRs *in vitro*

En la literatura encontramos métodos de lo más diversos para el estudio de toxicidad de NPs *in vitro*. Como por ejemplo, el uso de distintas líneas celulares en las que cada autor analiza distintos aspectos como la proliferación celular,

generación de ROS, muerte celular, etc [28]. Con toda esta variedad, los investigadores no se ponen de acuerdo en cuáles son los mejores métodos para determinar la toxicidad de las NPs. Dada la variedad de NPs utilizadas, diferentes concentraciones y métodos de análisis, es muy difícil comparar resultados de diferentes grupos [28]. Por ello nos propusimos analizar la toxicidad de los AuNPRs en diferentes líneas celulares y células primarias tanto humanas como de ratón, analizando diferentes aspectos para cada una de ellas como generación de ROS, caída de potencial mitocondrial, muerte celular o capacidad para formar colonias (viabilidad).

1.2.2 Estudio del efecto de AuNPRs sobre la actividad de células NK

La toxicidad de las NPs no siempre supone la muerte de la célula, es posible que afecte a su función aunque la célula siga viva [38]. La principal aplicación de estas NPs es su uso en el tratamiento del cáncer y el sistema inmune juega un papel importante en el desarrollo y eliminación de tumores [39], en especial las células asesinas naturales (NK). Por lo que pensamos que es importante analizar el efecto de estas AuNPRs sobre las células NK, analizando su activación y si se ve comprometida su capacidad de eliminar células tumorales en presencia de AuNPRs.

Para ello activamos células NK *in vitro* en presencia de los AuNPRs y analizamos su activación enfrentándolas a las células tumorales K562 (diana para las NK).

1.2.3 Estudio de biodistribución y toxicidad de AuNPRs *in vivo*

Finalmente es necesario un estudio toxicológico *in vivo*, ya que las NPs pueden sufrir cambios, ser degradadas y eliminadas o acumularse en tejidos y resultar tóxicas [38]. Así como de su farmacocinética para poder determinar su posible uso terapéutico [37].

Para ello se administraron los AuNPRs en ratones y se estudió su biodistribución al cabo de tres días y 4 meses. También se analizó la toxicidad que pueden suponer para distintos órganos mediante histología y análisis de marcadores toxicológicos en sangre.

Capítulo 2

Introducción

2.1. Muerte Celular

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado no sólo con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos, sino también, con varios tipos de enfermedades. Se han descrito numerosos mecanismos de muerte generalmente basados en criterios morfológicos, por lo que ha sido necesario establecer unos criterios de clasificación universales basados además de en cambios morfológicos, en aspectos bioquímicos. Según la definición del NCCD (*Nomenclature Committe on Cell Death*) [40] una célula se considera muerta cuando se dan uno o varios de los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

1. La célula ha perdido la integridad de la membrana.
2. La célula, incluyendo el núcleo, ha sufrido fragmentación completa, mostrando los llamados cuerpos apoptóticos.
3. Los fragmentos de la célula han sido fagocitados por las células adyacentes.

Según este comité existen 3 tipos de muerte celular; necrosis, apoptosis y autofagia. Estos procesos están regulados genéticamente y las vías de señalización están en muchos casos relacionadas entre sí [41].

2.1.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso celular que tiene especial importancia tanto durante el desarrollo embrionario [42], como durante la vida adulta en el mantenimiento de la homeostasis tisular. La apoptosis induce la eliminación de células dañadas, infectadas o aquellas cuya función ya no es necesaria para el organismo [22].

Existe un equilibrio entre proliferación y muerte celular en los tejidos. La ruptura de dicho equilibrio está relacionada con numerosas patologías [43], tanto por defecto de la apoptosis (cáncer, enfermedades autoinmunes, etc.), como por exceso (enfermedades neurodegenerativas, infección por VIH, etc.) [44, 45].

El término apoptosis fue introducido por Kerr y colaboradores [46] para describir un proceso basado en los siguientes **cambios morfológicos** (figura 2.1):

- Las células se van redondeando a la vez que se retraen sus pseudópodos

- Disminución del volumen celular
- Condensación de la cromatina (picnosis)
- Fragmentación nuclear
- Aparición de cuerpos apoptóticos (fragmentos de célula rodeados de membrana plasmática)

La apoptosis se caracteriza por mantener intacta la membrana plasmática durante todo el proceso. La formación de cuerpos apoptóticos, que tiene lugar en las últimas etapas, permite que sean fagocitados por células fagocíticas vecinas que los degradan rápidamente mediante sus enzimas lisosomales. Es por lo tanto lo que se denomina una muerte limpia, ya que de esta forma se evita la liberación del contenido citosólico y por lo tanto que se desencadene un proceso inflamatorio no deseado [47]. Por otro lado las células fagocíticas procesan los restos celulares produciendo la presentación de antígeno y la consecuente respuesta inmune específica mediante un proceso conocido como presentación cruzada [48].

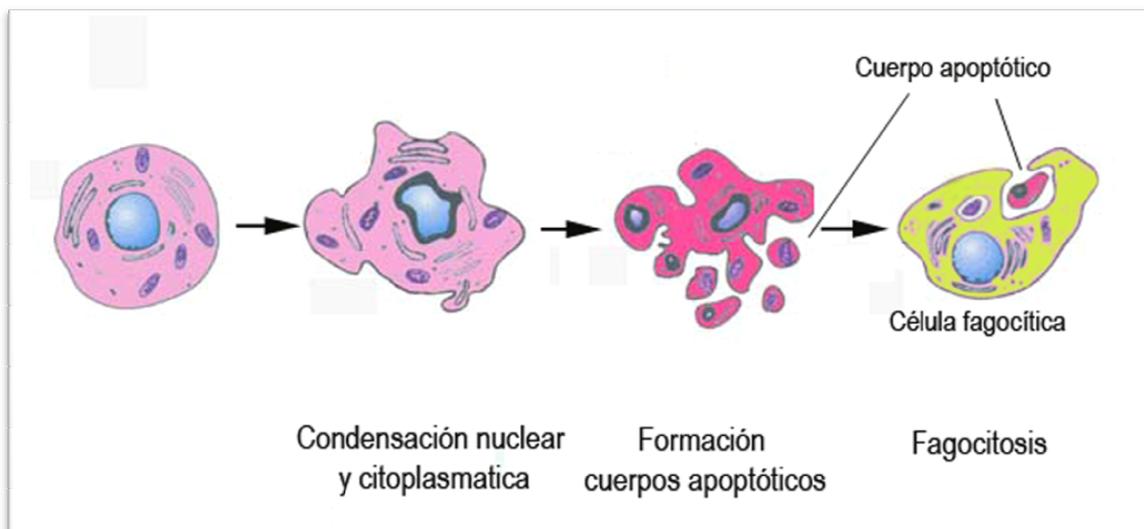


Figura 2.1: Cambios morfológicos en la célula durante la apoptosis [49].

Bioquímicamente, la apoptosis es un proceso a través del cual varias señales intracelulares llevan a la activación de unas proteínas denominadas caspasas [50].

2.1.1.1. Moléculas implicadas en la apoptosis

Antes de explicar los mecanismos de apoptosis se van a describir las principales moléculas implicadas en ellos.

2.1.1.1.1. Caspasas

Son una familia de cisteín proteasas con especificidad de corte tras un residuo aspártico (Asp). Se denominan con la palabra caspasa seguida de un número que las identifica. Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos, denominándose en esta forma inactiva como pro-caspasa seguido de su número correspondiente [51]. Esta familia se encuentra altamente conservada y las pequeñas variaciones estructurales que aparecen entre sus miembros son las responsables de la especificidad de sustrato [52].

Las caspasas participan en cascadas de señalización con un papel central en la apoptosis, regulación de la inflamación, proliferación y diferenciación celular. Según su función se clasifican en 2 grupos: Las que participan en procesos de **inflamación** (1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) [53] o las que participan en la **apoptosis** (2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10). Dentro de estas últimas tenemos que diferenciar a las *iniciadoras* (2, 8, 9, 10) de las *ejecutoras* (3, 6, 7) dependiendo de si inician la ruta o son las responsables últimas de ejecutar la apoptosis.

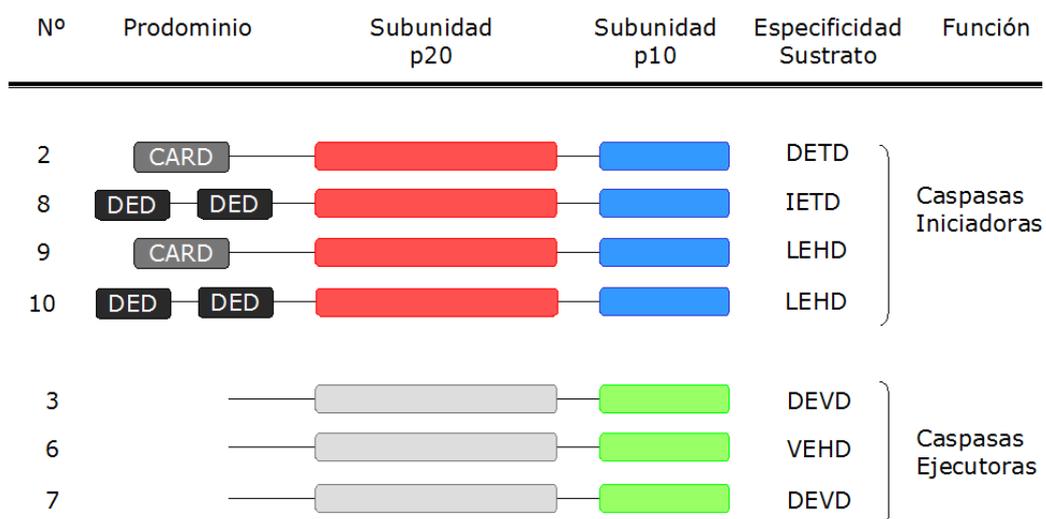


Figura 2.2: Caspasas apoptóticas. Entre las caspasas que participan en la apoptosis podemos diferenciar entre caspasas iniciadoras y ejecutoras. Estas caspasas presentan diferentes especificidades de sustrato y se diferencian según sus dominios; DED: Dominio efector de muerte, CARD: dominio de reclutamiento de caspasas [54].

Todas las caspasas se sintetizan como pro-caspasas y presentan 3 dominios (figura 2.2):

- Dominio central de unos 20 KDa (p20) con el sitio activo de la caspasa, un residuo cisteína dentro de una secuencia altamente conservada [55]
- Dominio C-terminal de unos 10 KDa (p10)

- Pro-dominio en el extremo N-terminal de longitud variable implicado en la traducción de señales. Este dominio pertenece a la familia TNF (factor de necrosis tumoral) y puede presentar a su vez dos subdominios:

- DED: Dominio efector de muerte
- CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas.

Su función y clasificación depende de su preferencia de sustrato y del prodominio que presenten (figura 2.2). Las caspasas ejecutoras presentan un prodominio corto mientras que las caspasas inflamatorias e iniciadoras presentan un prodominio largo con los subdominios DED o CARD necesarios para la interacción entre las caspasas y sus adaptadores, lo que es esencial para su activación [56].

Activación de las caspasas

La activación de las caspasas se produce por cortes proteolíticos y la maduración de la caspasa. Las caspasas una vez activas se presentan como heterotetrámeros formados por dos dímeros idénticos unidos por interacciones hidrofóbicas, cada uno de ellos con un sitio catalítico (figura 2.3). Estos dímeros están formados por una subunidad larga (p20) y una corta (p10) [56].

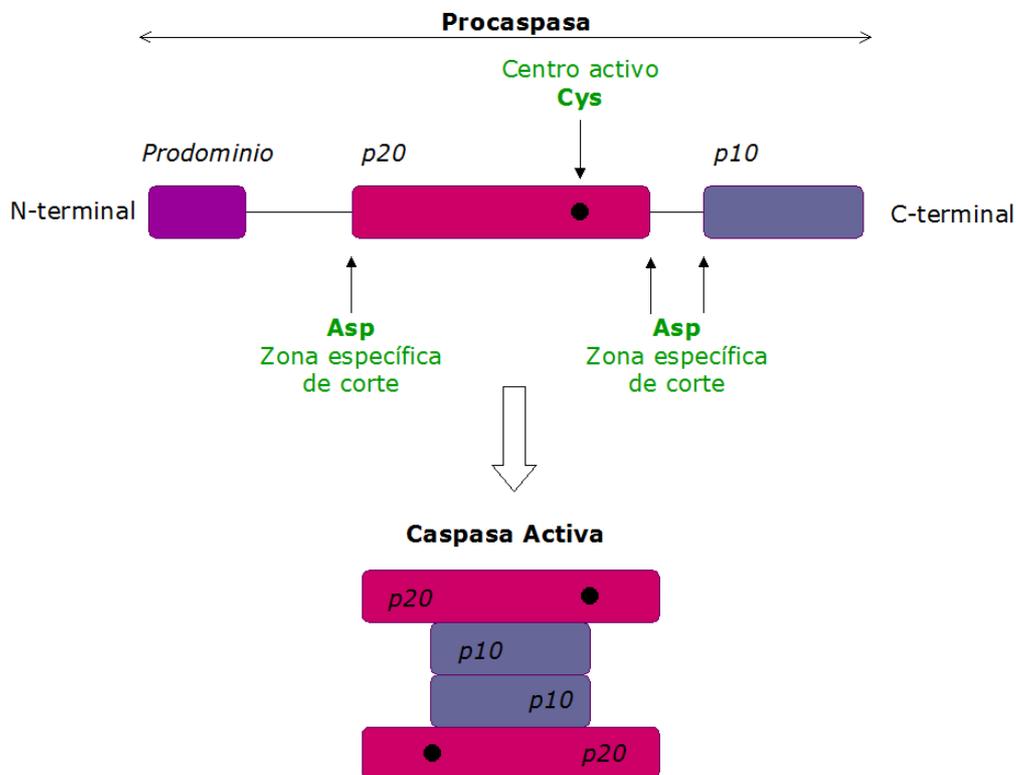


Figura 2.3: Activación de las caspasas [57]. Las pro-caspasas se activan por corte proteolítico en la zona específica de corte.

El mecanismo de activación es diferente dependiendo de la caspasa;

- Las pro-caspasas iniciadoras presentan cierta actividad catalítica y para que se activen es necesario su oligomerización. Esta oligomerización produce un cambio conformacional que activa la caspasa (como el caso de la caspasa 9) [58] o permite su autoproteólisis (como la caspasa 8) para su completa activación. Para ello es necesario que la caspasa se una a proteínas adaptadoras a través de sus dominios CARD o DED [59].
- Las caspasas ejecutoras son activadas por corte proteolítico llevado a cabo generalmente por las caspasas iniciadoras aunque también por otras proteasas como la granzima B (gzmB), una serín proteasa que también corta tras un residuo Asp [60].

Sustratos de las caspasas

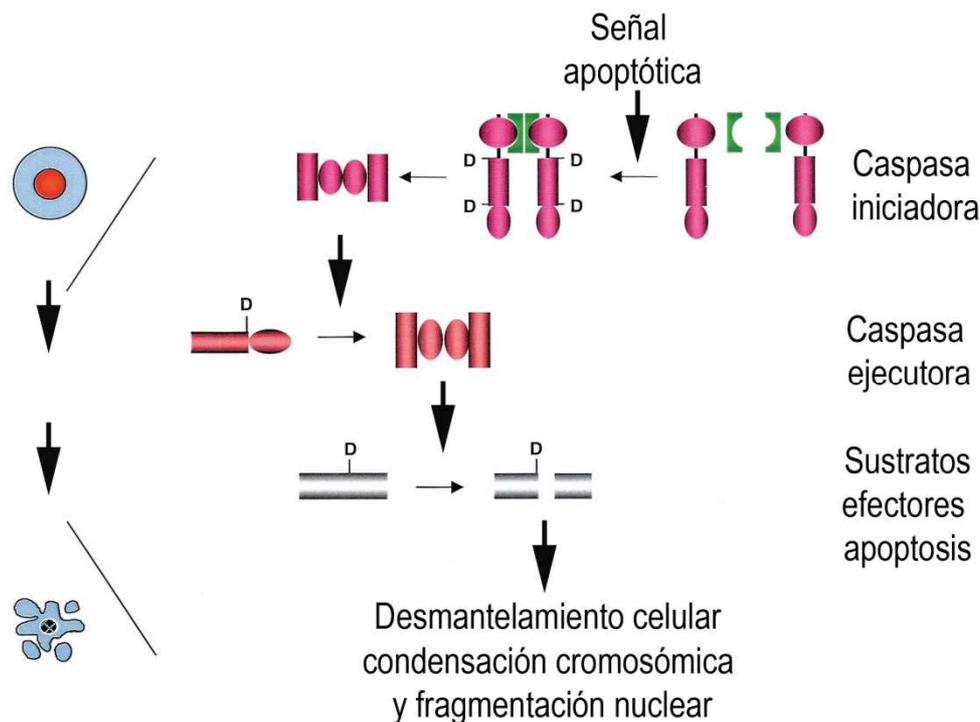


Figura 2.4: Papel de las caspasas en la apoptosis [55]. Tras la señal apoptótica las caspasas iniciadoras oligomerizan, lo que permite su activación. Estas caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras que a su vez actúan sobre distintos sustratos que llevarán finalmente a la muerte de la célula, según las características propias de la apoptosis.

Las caspasas activas tienen como sustratos multitud de proteínas celulares. Reconocen una secuencia corta de 4 aminoácidos en la que es esencial un

residuo Aspártico (Asp o D) tras el cual se produce el corte. Este corte puede dar lugar a la activación o inhibición de la proteína (figura 2.4). Las caspasas de cada uno de los grupos (inflamatorias, apoptóticas iniciadoras o apoptóticas ejecutoras) comparten especificidad de sustrato [61].

Las caspasas iniciadoras actúan sobre sí mismas (autoproteólisis) y sobre las caspasas ejecutoras, por lo que su preferencia de corte coincide con los residuos de su propio sitio de corte para su activación y los de las caspasas ejecutoras [62].

Dentro de los sustratos de las caspasas ejecutoras se encuentran proteínas implicadas en la degradación del DNA (ICAD) [63], en la parada del ciclo celular y relacionadas con el desmantelamiento celular, como por ejemplo la actina (ROCK1) [64, 65]. De esta forma se producen los cambios estructurales propios de la apoptosis. Además, son también sustratos moléculas que actúan como señales para la migración y activación de macrófagos (lisofosfatidilcolina) [66].

Regulación de las caspasas

Las caspasas activas pueden causar la muerte celular de forma rápida, por ello son necesarios unos mecanismos de regulación tanto de activación como de inhibición [62]. Los estudios estructurales de estas proteínas han llevado a la determinación de la especificidad de sustrato de cada una de ellas lo que ha permitido el descubrimiento de inhibidores naturales y posteriormente el desarrollo de nuevas moléculas que puedan actuar como tales [67].

Entre los inhibidores **naturales** se encuentran;

CrmA ("Cytokine response modifier A") que es una proteína del virus de la viruela bovina que se une a la caspasa 8 y bloquea la cisteína del sitio activo [68].

IAPs ("inhibitor of apoptosis proteins"), una familia de inhibidores de la apoptosis altamente conservados entre especies [69]. Entre ellos los XIAPs son los más importantes y actúan sobre las caspasas 3 y 7, 9 y 6 [70, 71]. Son inhibidores endógenos que a su vez presentan homólogos víricos. Se descubrieron por primera vez en baculovirus donde estaban implicados en la inhibición de la muerte de la célula huésped como respuesta a la infección. Mutaciones en estos inhibidores generan enfermedades debido a un exceso de apoptosis como es el caso de la atrofia muscular espinal [72]. También se ha visto la sobreexpresión de IAPs como survivina [73] en la mayoría de tumores más comunes [74], indicando su importancia para la supervivencia celular o la quimiorresistencia [75].

c-FLIP ("FLICE-like inhibitor protein") es un inhibidor por competición de la caspasa 8. Presenta DED a través del cual se une a FADD ("Fas associated death domain") impidiendo así la unión de la pro-caspasa 8 al complejo DISC ("Death-Inducing Signaling Complex") y por lo tanto su activación [76] (este mecanismo se explica más adelante). Además también se ha visto que activa NF-κB, implicado en supervivencia y proliferación.

Existen isoformas inactivas de las caspasas generadas por empalme o "splicing" alternativo que compiten con las caspasas activas. Y también es posible su regulación por la compartimentalización de las caspasas, proceso por el cual no se localizan en el mismo lugar donde actúan. Por ejemplo, si su papel se lleva a cabo en el núcleo, estas caspasas se localizan en el citosol [55].

Además de los inhibidores naturales se han desarrollado **péptidos sintéticos** imitando la secuencia de los sustratos específicos de las caspasas. Así tenemos el péptido DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) como inhibidor de las caspasas 3 y 7, IETD (Ile-Glu-Thr-Asp) para las caspasas 8 y 10 y z-VAD (Val-Ala-Asp) como inhibidor general de caspasas [77]. Estos péptidos suelen presentarse en forma de fluorometilcetona (fmk), que llevan a cabo la metilación de la cisteína del centro activo de las caspasas, produciendo una inhibición irreversible.

2.1.1.1.2. Proteínas de la familia Bcl2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son un grupo de proteínas que participan en la regulación de la apoptosis [78]. Todas ellas comparten la presencia de uno o varios dominios de homología a Bcl-2 (BH) y según éstos se pueden clasificar en tres grandes grupos [79] (figura 2.5):

Proteínas antiapoptóticas: son las proteínas Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1 entre otras. Poseen cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4) y su papel es el de inhibir la apoptosis.

Proteínas proapoptóticas multidominio: a este grupo pertenecen Bax, Bak y Bok, las cuales poseen los dominios BH1, BH2 y BH3. Bak y Bax son las proteínas responsables de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial gracias a su oligomerización y formación de un poro. Éste permite la salida de determinadas proteínas mitocondriales al citosol lo que se considera como punto de no retorno en el mecanismo de apoptosis.

Proteínas proapoptóticas sólo-BH3 (BH3-only): son un grupo numeroso de proteínas que sólo poseen el dominio de homología BH-3. Entre ellas están

Bim, Bid, Bad, Puma o Noxa. Estas proteínas actúan como efectoras de los estímulos proapoptóticos.

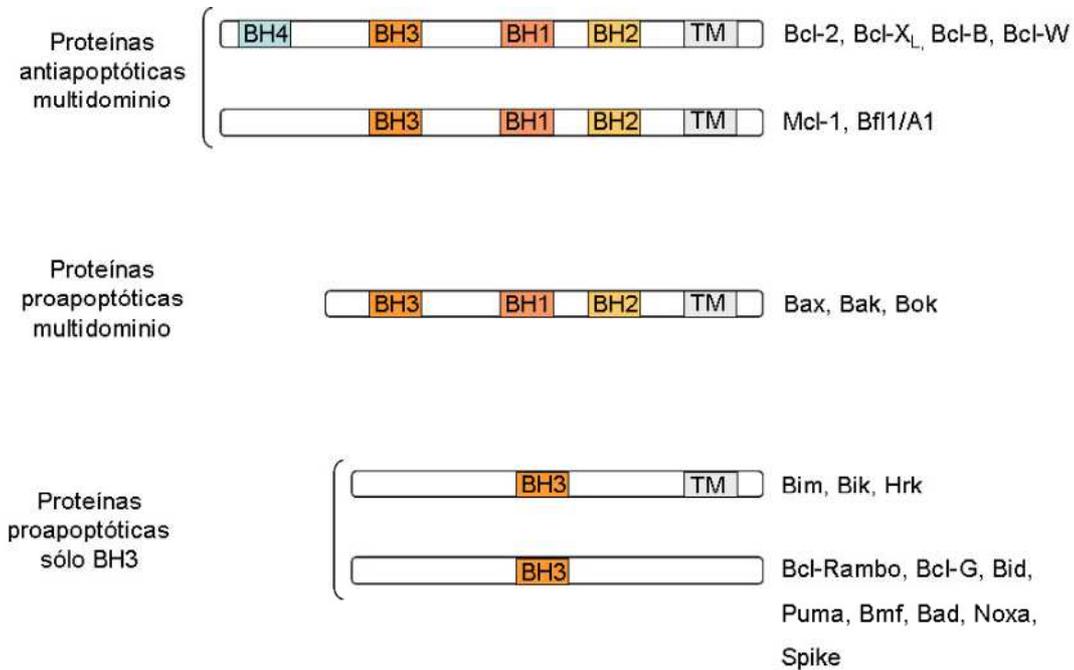


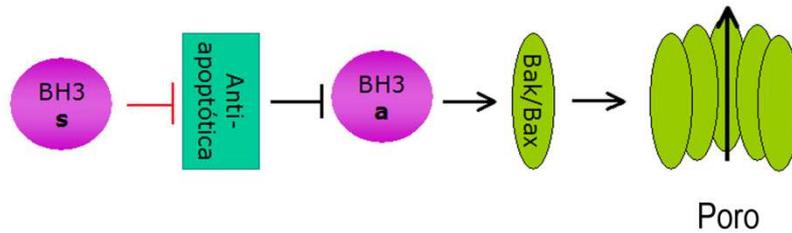
Fig. 2.5: Miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Clasificación. Las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican según su estructura. TM, dominio transmembrana; BH1-4, dominios de homología a Bcl-2 [80].

Regulación de la activación de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax

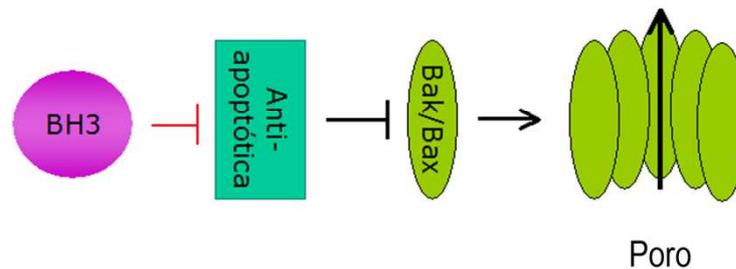
Frente a diversos estímulos que activan la apoptosis, que la célula sobreviva o muera depende de la interacción entre las proteínas de la familia Bcl-2 [81]. Esta interacción lleva a la activación o inhibición de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak [79]. Diversos modelos han sido propuestos para explicar la relación entre estas proteínas [82] (figura 2.6):

El **modelo directo** (figura 2.6 A) propone que dentro de las proteínas sólo-BH3 existen unas que son activadoras (a) y otras sensibilizadoras (s). Las sólo-BH3 activadoras son las encargadas de activar Bax y Bak y las proteínas antiapoptóticas inhiben la apoptosis secuestrando a las proteínas sólo-BH3 activadoras para impedir que interaccionen con Bax y Bak. En este contexto, las proteínas sólo-BH3 sensibilizadoras serían las que, bajo estímulos proapoptóticos, se unirían a las proteínas antiapoptóticas liberando las sólo-BH3 activadoras para que puedan unirse a Bax y Bak promoviendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial [83].

A) Modelo directo



B) Modelo indirecto



C) Modelo mixto

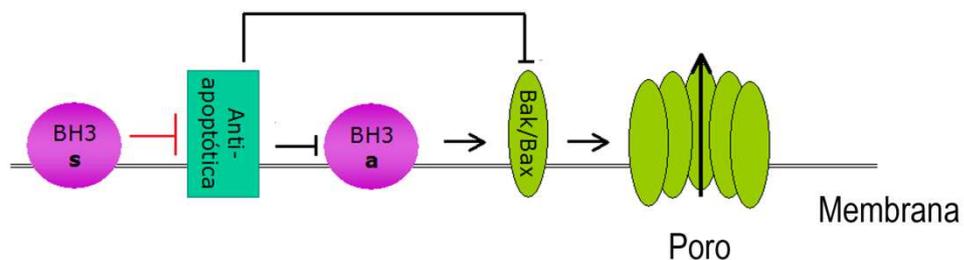


Figura 2.6: Modelos de activación de las proteínas de la familia Bcl-2 [82]. Las flechas en negro representan las interacciones en condiciones normales, en rojo se representa el estímulo proapoptótico.

Según el **modelo indirecto** (figura 2.6 B) (o modelo de desplazamiento) las proteínas antiapoptóticas se unen directamente a las proteínas proapoptóticas Bak y Bax inhibiendo su acción. En este modelo, los estímulos proapoptóticos promueven que las proteínas sólo-BH3 interactúen con las proteínas antiapoptóticas liberando Bak y Bax para la formación del poro [84].

Existe un tercer **modelo mixto** o *alternativo* (figura 2.6 C) que intenta unificar las evidencias de uno y otro, dejando claro que la membrana lipídica donde se anclan las proteínas juega un papel importante en la interacción y activación de éstas. En este modelo, las proteínas antiapoptóticas interactúan tanto con las sólo-BH3 activadoras como con Bax y Bak directamente para impedir, de las dos formas, su oligomerización y formación

del poro. En este caso, bajo señales pro-apoptóticas las proteínas BH3 sensibilizadoras se unirían a las antiapoptóticas para liberar tanto a las BH3 activadoras como a las proapoptóticas Bax y Bak [85].

2.1.1.2. Mecanismos de apoptosis

Tradicionalmente se han distinguido 3 rutas principales de apoptosis; *La vía intrínseca*, en la que juega un papel central la mitocondria, es activada por las proteínas de la familia Bcl-2. Las otras dos vías son activadas por células del sistema inmune como los linfocitos T citotóxicos (CTLs) o las células NK ("Natural Killers"). Estas células reconocen las células infectadas o transformadas y son capaces de inducir su muerte a través del sistema de *receptores mortales* (o vía extrínseca) o a través de la *secreción de gránulos citotóxicos*.

2.1.1.2.1. Vía intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca se activa por una serie de señales intracelulares desencadenadas por estrés celular como daño en el DNA, estrés oxidativo (ROS), citotóxico o en el retículo endoplasmático (RE), falta de factores de crecimiento, etc.

En esta ruta la mitocondria desempeña el papel principal y viene regulada por las proteínas de la familia Bcl-2. Tras el estímulo pro-apoptótico se activan Bak y Bax (como se explicó en el apartado anterior) formando un poro en la membrana externa mitocondrial denominado MOMP (del inglés "Mitochondrial Outer-Membrane Pore"). En condiciones normales, Bak se encuentra unida a la membrana externa mitocondrial, sin embargo, tanto Bax como Bid son proteínas citoplasmáticas que tras el estímulo apoptótico se traslocan y anclan a la membrana externa mitocondrial [86] mediante homo-oligomerización (Bax/Bax o Bak/Bak) o hetero-oligomerización (Bax/Bak, Bax/tBid) [87, 88].

La regulación de la formación de este poro viene determinada por proteínas de la familia Bcl-2 y su formación supone la salida al citosol de factores apoptogénicos que se encuentran en condiciones normales en el espacio intermembrana de la mitocondria. Estos factores apoptogénicos tienen distintos papeles y llevan a la muerte celular dependiente o independiente de caspasas [89] (figura 2.7).

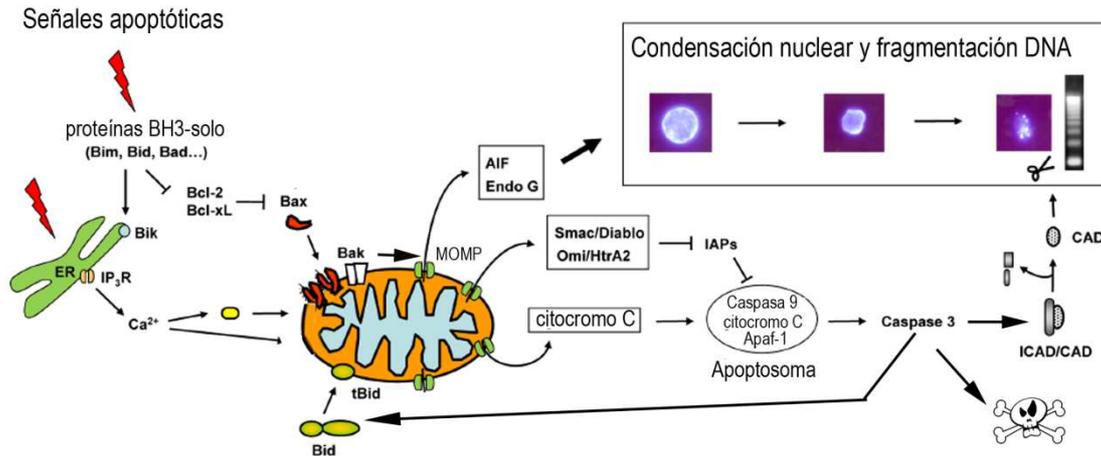


Figura 2.7: Vía intrínseca. Tras las señales pro-apoptóticas se produce la oligomerización de Bak y Bax formando un poro en la membrana externa mitocondrial (MOMP) a través del cual salen distintos factores apoptogénicos que presentan diferentes funciones y llevan a la muerte celular. Adaptado de Jeong et al [90].

Algunos de los factores apoptogénicos que se liberan de la mitocondria son:

- **Citocromo C:** en condiciones normales se encuentra en el espacio intermembrana actuando como transportador de electrones en la respiración mitocondrial. Su salida al citosol se considera como punto de no retorno. Una vez en el citosol, en presencia de dATP, se asocia a varias unidades de Apaf-1 ("apoptosis protease activating factor 1") de forma que las estabiliza permitiendo la unión de la pro-caspasa 9 a través de los dominios CARD de ambas. Todas estas moléculas forman lo que se denomina apoptosoma [91] (figura 2.8). De esta forma la caspasa 9 se activa siendo capaz de activar a las caspasas efectoras 3 y 7 que son las que ejecutan la apoptosis.
- **SmaC/DIABLO:** Inhibe la acción de los inhibidores de caspasas (IAPs) que en condiciones normales están asociados a las caspasas manteniéndolas inactivas. De esta forma las caspasas activas quedan libres para poder actuar [92, 93].
- **AIF:** Factor inductor de apoptosis ("apoptosis inductor factor"). Flavoproteína asociada a la cadena transportadora de electrones (membrana mitocondrial interna). Su liberación depende de un corte proteolítico que puede producirse por la calpaína o por catepsinas, una vez en el citosol se trasloca al núcleo y forma un complejo con otras proteínas llevando a la degradación del DNA [94, 95].
- **Endonucleasa G (EndoG):** Una vez liberada de la mitocondria se trasloca al núcleo donde procede a la degradación del DNA [96].

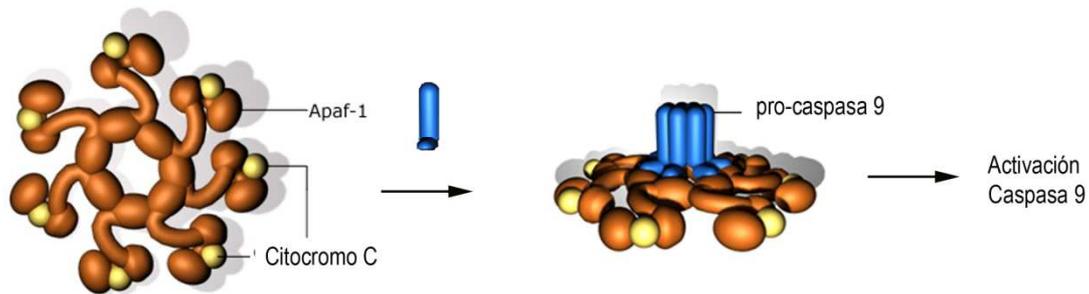


Figura 2.8: Activación de la caspasa 9. Para la activación de la caspasa 9 es necesario la formación del apoptosoma, compuesto por varias subunidades de Apaf-1 y citocromo C a las que en presencia de dATP se une la pro-caspasa 9. Basada en [97].

La salida de citocromo C y Smac/DIABLO induce muerte dependiente de caspasas, mientras que la de AIF y EndoG es independiente [22].

La salida de todas estas moléculas no ocurre de forma simultánea, ya que cada una se encuentra más o menos secuestrada en el espacio intermembrana. AIF está asociado a la membrana interna y es necesario un corte proteolítico para su liberación y sólo el 15-20% del citocromo C está disponible en el espacio intermembrana [98]. El fragmento truncado de Bid (tBid) es responsable de la movilización del citocromo C [99], acercándolo a la membrana externa mitocondrial, así como de su liberación al favorecer la formación del poro a través del cual sale al citosol (para esta función necesita el dominio BH3) [100, 101]. Por otro lado la liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria es dependiente de caspasas [102].

La formación del MOMP puede venir acompañada de la permeabilización de la membrana mitocondrial interna. Esta permeabilización se debe a la formación de un poro transitorio llamado PTP ("Permeability Transition Pore") que se forma en las zonas de unión de ambas membranas. Esta apertura produce una caída de potencial mitocondrial que puede recuperarse cuando se cierra el poro. En condiciones normales la conformación va cambiando entre abierta y cerrada [103], pero su apertura es muy sensible a la concentración de Ca^{2+} , agentes oxidativos, quimioterapéuticos, etc [104]. Cuando se abre permanentemente, permite la entrada y salida de agua e iones equilibrándose a ambos lados de la membrana produciendo un choque osmótico que acabará con la ruptura de la membrana externa. De esta forma se produce también la salida de factores apoptogénicos [89]. En este caso la caída de potencial mitocondrial es independiente de caspasas.

La regulación de la apertura de este poro, que se mide por caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y su importancia no quedan claras todavía. Algunos trabajos lo consideran imprescindible para la completa salida de citocromo C [105], aunque en otros casos se ha visto que con la formación del MOMP por la activación de Bid y Bax es suficiente [106]. Además, se ha visto que la caída de $\Delta\Psi_m$ se inhibe con inhibidores de caspasas, pero no la salida de citocromo C [106]. En este caso la caída de $\Delta\Psi_m$ se debería a que las caspasas pueden cortar la subunidad NDUSF1 del complejo I de la cadena transportadora de electrones causando la pérdida de funcionalidad de la mitocondria [107]. Así se produce una retroalimentación positiva que facilita la salida de más factores apoptogénicos y por lo tanto la muerte de la célula.

2.1.1.2.2. Vía de los receptores mortales

Esta ruta es activada por la unión de ligandos a sus receptores mortales y depende de caspasas y de proteínas adaptadoras.

Activación de las caspasas iniciadoras

Para la activación de esta vía es necesario que la célula diana exprese receptores mortales. Estos receptores son receptores transmembrana de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) [108].

La unión de los ligandos mortales a los receptores correspondientes permite su oligomerización y promueve la unión de moléculas adaptadoras a través de los dominios de muerte, DD ("death domain") que presentan tanto los receptores como las moléculas adaptadoras. En el caso de FasL y Apo2L/TRAIL esta molécula es FADD ("Fas associated death domain"), mientras que en el caso de TNF- α la molécula que actúa como adaptador es TRADD ("TNF receptor associated death domain") [109].

La proteína adaptadora además presenta un dominio efector de muerte (DED) por el cual se unen las pro-caspasas 8 y 10 formando un complejo llamado complejo de señalización de muerte celular o DISC formado por el receptor, la molécula adaptadora y la pro-caspasa [110]. Como hemos explicado anteriormente, la pro-caspasa 8 presenta cierta actividad proteolítica en su forma inactiva, por lo que basta con la alta concentración local y la proximidad de las pro-caspasas en el DISC para que se produzca el procesamiento de unas a otras, dando lugar a la forma activa de la caspasa 8 [111] (figura 2.9).

Mecanismo de activación de las caspasas ejecutoras

Según la vía por la que la caspasa iniciadora active a las caspasas ejecutoras, podemos dividir a las células en dos grupos: células de tipo I y células de tipo II [112, 113] (Figura 2.9).

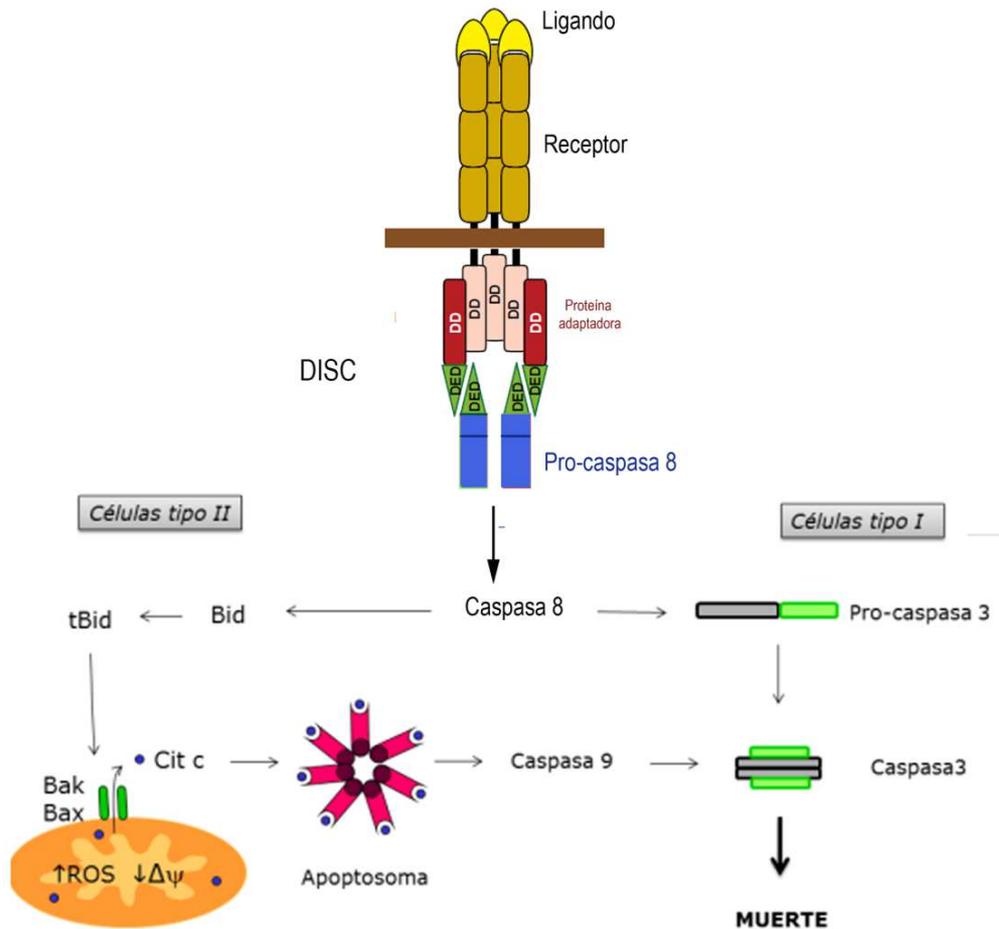


Figura 2.9: Activación de la caspasa 8. La unión del ligando a su receptor permite su oligomerización y el reclutamiento de proteínas adaptadoras a las cuales se une la pro-caspasa 8 formando un complejo denominado DISC. Esto permite la activación de la caspasa 8 [109] [54].

Las “células tipo I” son aquellas que son capaces de producir, a través del DISC, niveles suficientes de caspasa 8 para activar directamente a la caspasa 3 [113]. La muerte en este tipo de células solo se inhibe con inhibidores de caspasas.

Por el contrario, en las “células tipo II” se requiere una amplificación de la señal a través de la mitocondria, debido a los bajos niveles de caspasa 8 activa. En estas células la caspasa 8 activa, proteoliza a la proteína solo-BH3

Bid, originando tBid, que se trasloca a la mitocondria, donde provocará la permeabilización de la membrana mitocondrial y la consiguiente liberación de factores apoptogénicos a través del cambio conformacional de Bak y Bax (como ya se ha explicado anteriormente) [114]. La muerte en este tipo de células además de por inhibidores de caspasas puede ser inhibida por proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl2 como Bcl2 y Bcl_{X_L} [115].

Receptores mortales

Los receptores y sus correspondientes ligandos más importantes de esta familia son: Fas/FasL (también denominados CD95/CD95L), TNF- α R1/TNF α y DR4 y DR5/TRAIL(Apo2L) [109].

Fas

Fas es un receptor de la familia TNF que está presente en muchos tipos celulares. Sin embargo, su ligando se expresa en células hematopoyéticas, principalmente en células NK, linfocitos B, T y células dendríticas.

El ligando de Fas es una glicoproteína de membrana cuya expresión es inducida a través de la activación específica de receptores de membrana como el receptor de antígeno de las células T (TCR) [116]. Se ha descrito además, que en los linfocitos T humanos tras unos días de activación en presencia de IL-2, FasL se almacena en el citoplasma dentro de cuerpos multivesiculares [117] y es secretado al exterior celular en la superficie de exosomas [118].

La expresión de este ligando en las células efectoras del sistema inmune produce la muerte de la célula diana que expresa Fas. El sistema Fas/FasL participa en la eliminación de células infectadas o tumorales. Sin embargo, su papel fundamental es el control de la acción del sistema inmune, produciendo la muerte de células T permanentemente activadas en un proceso conocido como muerte celular producida por activación (AICD, "Activation Induced Cell Death") [119], evitando así enfermedades autoinmunes. Por otra parte, FasL no sólo está implicado en muerte celular sino también en el control de la expansión clonal y la proliferación de los linfocitos T activados, a través de la inducción de la expresión del regulador del ciclo celular p21 [120].

TNFR1

Es una glicoproteína de membrana que se expresa en células hematopoyéticas y en células tumorales. Su ligando, TNF- α , es una citoquina secretada por muchos tipos de células, entre ellos macrófagos, células T y células NK.

La unión del ligando al receptor puede desencadenar multitud de señales [121] como diferenciación, proliferación o inflamación, a través del factor de transcripción NF- κ B [122, 123]. Cuando la señalización a través de éste está bloqueada [124] induce apoptosis a través de diferentes moléculas adaptadoras como FADD [125]. Si las caspasas están inactivas induce necroptosis (que se explica a continuación en el apartado 2.1.2) [126].

DR4 y DR5

Son los dos receptores proapoptóticos conocidos para Apo2L/TRAIL [127, 128]. Ambos receptores se expresan en gran cantidad de tejidos, tanto normales como tumorales [129]. Además se han descrito otros dos receptores, DcR1 y DcR2, los cuales carecen de dominio mortal, por lo que no inducen apoptosis. Se han denominado receptores señuelo y su papel parece ser antiapoptótico por competir con DR4 y DR5 por el ligando [127]. Estos receptores señuelo se han descrito en muchos tejidos sanos pero pocos tumorales.

Este sistema juega un papel importante en la acción del sistema inmune. Su ligando Apo2L/TRAIL es una glicoproteína de membrana que se expresa preferentemente en células hematopoyéticas [130], entre ellas linfocitos T y células NK [131-133]. Su expresión aumenta con la activación de estos tipos celulares [133, 134] y se libera asociado a microvesículas (exosomas) [117]. De esta forma actúa sobre células tumorales.

El sistema Fas/FasL es muy importante en la regulación de CTLs y células NK activas, DR4 y DR5 también participan en este proceso inhibiendo la proliferación de estas células [135]. Como en el caso de TNFR, la unión de Apo2L/TRAIL a sus receptores puede inducir apoptosis o proliferación, invasión, inflamación, etc, dependiendo del tipo celular. Esto es debido a la interacción con diferentes moléculas como TRADD y RIP, induciendo la activación de factores transcripcionales como NF- κ B y ERK [136]. Lo que ocurre por ejemplo en el caso de las células T CD4⁺ reguladoras [137].

2.1.1.2.3. Vía de los gránulos citotóxicos

Esta vía de muerte celular es un mecanismo activado principalmente por dos tipos de células efectoras del sistema inmune, CTLs y células NK. Llamamos células efectoras a las que llevan a cabo la eliminación de la célula tumoral o infectada (células diana), pero hay otros componentes del sistema inmune que ayudan a la activación y regulación de las células efectoras, como monocitos y macrófagos o células dendríticas.

Los linfocitos T se generan en la médula ósea pero maduran en el timo. En el proceso de maduración, el linfocito T expresa en la membrana un receptor

llamado TCR ("T Cell Receptor") a través del cual es capaz de reconocer un antígeno extraño [138] pero únicamente si está unido a proteínas de membrana llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Existen dos poblaciones de linfocitos T que se diferencian en los que expresan CD4 (linfocitos T CD4⁺ o reguladores) que reconocen antígenos exógenos unidos a MHC-II y participan en la inflamación y en la activación de otras células del sistema inmune. Y los que expresan CD8 (linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos) que reconocen antígenos endógenos unidos a MHC-I y participan en la eliminación de células tumorales o infectadas. El reconocimiento del antígeno por el TCR lleva a la activación de estas células que pasan a denominarse CTLs.

Las células NK son células citotóxicas que eliminan células infectadas o tumorales pero que carecen de receptores de membrana que reconocen antígeno. Estas células forman parte de la inmunidad innata, por lo que su respuesta es más inespecífica. Las NK utilizan dos categorías diferentes de receptores, unos proporcionan señales de inhibición y otros de activación. El equilibrio entre estas señales de activación/inhibición hace que las NK distingan entre las células sanas y las tumorales o infectadas [139]. Para que la célula NK se active es necesario que haya señales de activación y si existen señales de inhibición es posible la activación de las NK si el balance se inclina a favor de las señales de activación [140, 141].

Estas células presentan unos gránulos citotóxicos que contienen una serie de moléculas a través de las cuales inducen la muerte de la célula diana. Los linfocitos T sin activar presentan un número muy bajo de gránulos citotóxicos, que aumenta al activarse. Las células NK poseen más gránulos a nivel basal, pero su número también aumenta tras su activación en presencia de citoquinas.

Tras entrar en contacto estas células con la célula diana, bien a través del TCR en CTLs o de los receptores de activación de las células NK, se produce la migración de los gránulos citotóxicos hacia la zona de unión de las dos células conocida como sinapsis inmunológica. Allí se fusionan con la membrana plasmática, liberando su contenido al exterior celular [142].

Son varias las moléculas presentes en estos orgánulos, entre las que se encuentran las granzimas (gzms). Las gzms son una familia de serín proteasas de las que se conocen 5 en humanos y 10 en ratón [143]. Las mejor caracterizadas y más abundantes son la gzm A y B. La gzmB presenta un papel importante en la muerte celular, sin embargo a la gzmA se le ha atribuido un papel inflamatorio [144]. Por ello, en este apartado sólo vamos a describir el papel de la gzmB y el de la perforina, otra proteína presente en los gránulos citotóxicos esencial para que la gzmB pueda actuar.

Perforina

Es una proteína de unos 66 KDa, que forma poros en la membrana plasmática [145]. La perforina por sí sola no es capaz de matar células, ya que éstas son capaces de reparar el poro por diferentes mecanismos [146]. Su papel consiste en permitir la entrada de las gzm a la célula diana que son las que inducen la muerte celular [147, 148].

Granzima B

Es una serín proteasa con especificidad de corte similar al de las caspasas. Se sintetiza como zimógeno y es procesada y activada justo en el momento en el que se incorpora a los gránulos citotóxicos, gracias a la acción de la catepsina C (proteasa presente en el interior de estas vesículas) [149]. Sin embargo, no es hasta el momento en el que se libera de los gránulos citotóxicos cuando adquiere su capacidad proteolítica, debido a la acidez de estas vesículas [150].

Su principal función una vez en el citoplasma de la célula diana es la de provocar la muerte de las células tanto infectadas [151] como tumorales [152], generalmente por apoptosis. También puede intervenir en otros procesos como la regulación de la inflamación, inactivación de virus, modificación de la matriz extracelular o el control de linfocitos activados [153-157].

El papel de la gzmB en la apoptosis se lleva a cabo a través de 3 mecanismos, 2 de ellos dependientes de caspasas, por activación directa o a través de la vía mitocondrial [158] y un tercero independiente de caspasas del que aún no se conoce mucho (figura 2.10).

Su especificidad de corte tras un residuo aspártico es similar al de las caspasas, por lo que comparten algunos sustratos, aunque esta especificidad es más restrictiva en el caso de la gzmB [159]. Uno de los sustratos de la gzmB es la pro-caspasa 3 que se activa por corte proteolítico en aspártico [158, 160].

La gzmB también puede actuar proteolizando la proteína proapoptótica solo-BH3 Bid dando lugar a tBid que actúa sobre la mitocondria produciendo la salida de factores apoptogénicos (como se explicó en el apartado 2.1.1.2.1) [161].

Existe controversia en si uno de estos dos mecanismos es el principal y el otro es un mecanismo de amplificación de la señal apoptótica [162]. Se ha sugerido que eso depende del tipo celular. Parece ser que en ratón la gzmB tiene mayor preferencia por la pro-caspasa 3, mientras que en humano la mayor afinidad es hacia Bid [163, 164]. Aunque hay que señalar que estos

estudios se han realizado con proteínas purificadas, por lo que son necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis [165]. Recientemente se ha descrito que la *gzmA* es también capaz de activar la vía mitocondrial a través de la activación de la proteína solo-BH3 Bim [166].

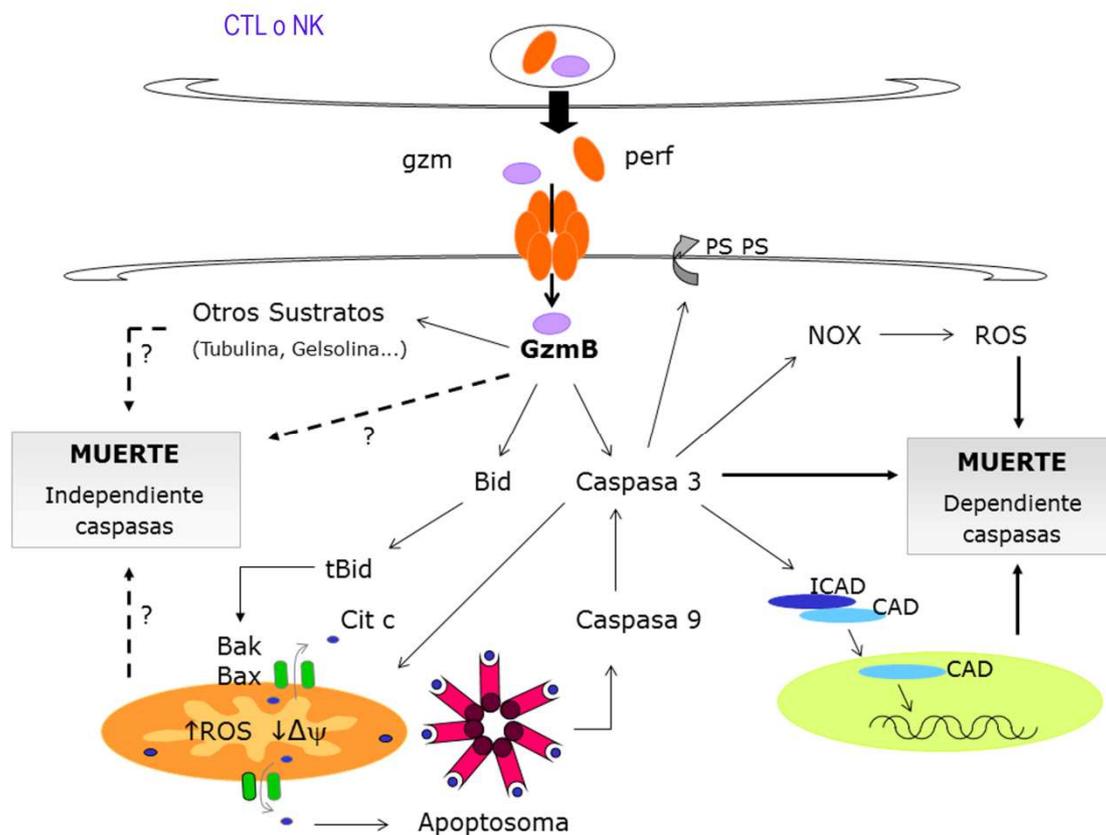


Figura 2.10: Mecanismo de acción de la *gzmB* [54].

Podemos decir que la *gzmB* es capaz de provocar caída de potencial mitocondrial a través de dos vías diferentes; una dependiente de Bid, Bak y Bax que implica la salida de citocromo C y otra dependiente de caspasas acompañada por un aumento en la producción de ROS [158, 161]. La *gzmB* es capaz de generar ROS mediante la activación de NADPH oxidasas, a través de un mecanismo dependiente de la caspasa 3 [167].

Se ha descrito un tercer mecanismo de acción independiente de caspasas, del que aún no se conoce mucho, pero en el que parece que está implicado el citoesqueleto. Como hemos comentado anteriormente, existen algunos sustratos de las caspasas efectoras que son compartidos con la *gzmB*. Por ejemplo, la α -tubulina [168] o la filamina [169], lo que contribuye a la desorganización del citoesqueleto y podría inducir muerte celular. También se ha descrito que la *gzmB* procesa directamente ICAD provocando la activación

de CAD de modo independiente de caspasas [170]. Estos sustratos pueden contribuir a la muerte de la célula, pero hay que señalar que la afinidad de la gzmB por ellos es mucho menor que por las caspasas o Bid, por lo que estos mecanismos solo serán activados en el caso en el que la vía de las caspasas o la de Bid estén alteradas [153].

2.1.2. Necrosis

Aunque los cambios morfológicos que se observan en la célula necrótica dependen de la severidad del daño, es un tipo de muerte que se caracteriza principalmente por el aumento del tamaño celular y la ruptura de la membrana plasmática. La necrosis carece de marcador específico, aparte de la permeabilización de la membrana, por lo que se considera necrosis al proceso de muerte en el que no hay evidencia ni de apoptosis ni de autofagia [171].

A diferencia de la apoptosis las células necróticas no son fagocitadas hasta que han perdido la integridad de la membrana, con la consecuente liberación del contenido citoplasmático al exterior. Esto hace que se desencadene una respuesta inflamatoria por liberación pasiva de DAMPS ("danger/damage associated molecular patterns") o por la inducción de secreción de citoquinas pro-inflamatorias a través de la activación de NF- κ B y MAPKs [172, 173]. Debido a esto, la necrosis normalmente está asociada a patologías [174, 175].

Hay muchos mediadores implicados en la necrosis como ROS, Ca^{2+} , calpaínas, catepsinas, fosfolipasas y ceramida [176]. El estrés oxidativo conduce al daño de macromoléculas incluido el DNA y proteínas. La modificación de las proteínas debido a la generación de ROS hace que pierdan su función y aumente su susceptibilidad a ser degradadas. Los ácidos grasos poli-insaturados de la membrana también son susceptibles a la generación de ROS, ya que son extremadamente sensibles a la oxidación. De esta forma las membranas se desestabilizan, esto altera la función de las mitocondrias y permite la salida de enzimas lisosomales y Ca^{2+} de los lisosomas y del retículo endoplasmático (RE) respectivamente. El Ca^{2+} provoca la apertura del PTP en la mitocondria [88] y acaba por generar la ruptura de la membrana mitocondrial externa por choque osmótico. Si esto ocurre en la mayoría de las mitocondrias se produce un déficit de ATP celular. Además el Ca^{2+} puede activar proteasas, fosfolipasas, etc, que contribuyen a la necrosis.

Durante mucho tiempo la necrosis se ha considerado una forma de muerte accidental e incontrolada. Sin embargo en la última década se han observado evidencias de que la necrosis está regulada por una serie de señales desencadenadas por una variedad de estímulos (figura 2.11), por lo que ha aparecido el término necroptosis [40, 177].

Esta necrosis regulada o necroptosis se puede definir como una muerte celular a través de una ruta dependiente del complejo formado por RIPK1/RIPK3, que puede ser inhibida por necrostatina (Nec-1) [178]. Los receptores de la familia del TNF inducen cascadas de señalización con funciones completamente opuestas (figura 2.11). Pueden inducir proliferación si RIPK1 se encuentra ubiquitinada. Si la caspasa 8 está activa se forma un complejo que induce apoptosis, sin embargo si la caspasa 8 está inhibida el complejo que forma con RIPK1 y RIPK3, denominado necroptosoma, induce necroptosis [179]. Por lo que en determinadas circunstancias en las que las caspasas están inhibidas, la necroptosis interviene en el desarrollo embrionario [180], en el mantenimiento de la homeostásis celular [181, 182] y en el control de infecciones [183] como una alternativa a la apoptosis.

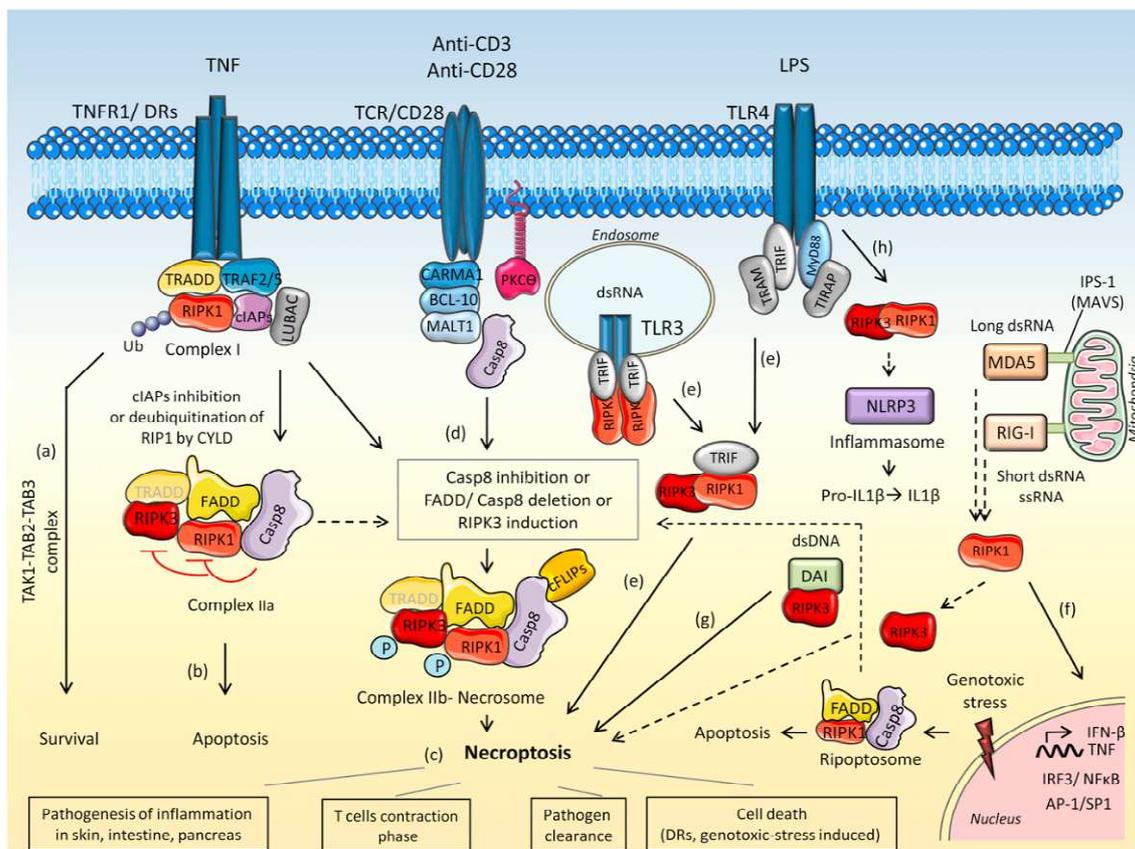


Figura 2.11: Necroptosis bajo diferentes estímulos [183].

2.1.3. Autofagia

La autofagia es un proceso lento en el cual parte del citoplasma de la célula es secuestrado en vacuolas especializadas de doble membrana y degradado por enzimas lisosomales [184]. Es un mecanismo conservado en eucariotas que permite así la degradación y reciclado de los componentes celulares. El proceso de autofagia es desencadenado por falta de nutrientes, alta densidad

celular o aumento de la temperatura [185]. Niveles basales de autofagia aseguran el mantenimiento de la homeostasis intracelular. Sin embargo, se ha visto que también desempeña un papel importante en procesos celulares como la diferenciación, desarrollo, longevidad y sistema inmune [186-188].

El papel de la autofagia en la muerte celular ha sido ampliamente debatido. Algunos grupos sostienen que la autofagia es la causa de la muerte [189], mientras que otros opinan que es un mecanismo de defensa [190]. En condiciones normales la autofagia permite a la célula regenerarse, mientras que en situaciones de estrés sirve de mecanismo de defensa ya que de esta manera la célula elimina los agregados de proteínas y orgánulos dañados [191]. Sin embargo, también se ha observado que en situaciones en las que la apoptosis está inhibida, se produce muerte como si fuera necrosis la cual va acompañada de autofagia, además existen conexiones entre apoptosis, autofagia y necrosis [192-194]. Debido a esta controversia se denomina muerte por autofagia al proceso en el que se produce muerte acompañada de autofagia [171].

Existen distintos tipos de autofagia, la mediada por chaperonas, la micro-autofagia y la macro-autofagia (a partir de ahora llamada autofagia) que es de la que vamos a hablar en este apartado.

La autofagia se caracteriza por ausencia de condensación de cromatina y la presencia de vacuolas de doble membrana llamadas autofagolisosomas, que contienen orgánulos citoplasmáticos y citosol [195]. Estas vacuolas se pueden distinguir de otros orgánulos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) gracias a su doble membrana y por la distribución de la proteína LC3 en su membrana [196].

La vía típica de autofagia es controlada por mTOR, una kinasa importante en la progresión del ciclo celular [197]. En respuesta a una falta de nutrientes o a la acción de determinadas drogas como rapamicina, mTOR es inhibido activándose la autofagia [198]. La autofagia está controlada por una serie de proteínas de la familia Atg descubiertas en levaduras, que presentan su homólogo en eucariotas [199, 200]. En la activación de la autofagia interviene la proteína Beclina-1 también llamada Atg6, a la que se une Bcl-2 inhibiendo la autofagia. En situación de falta de nutrientes Bcl-2 es fosforilado lo que permite la liberación de la beclina-1 activándose la autofagia [201]. El primer paso y en el que intervienen más proteínas de la familia Atg es la elongación de la vesícula, que forma el denominado autofagosoma. LC3 se une a fosfatidiletanolamina (PE) localizándose en la membrana del autofagosoma, utilizándose como marcador de autofagia. Finalmente el autofagosoma se fusiona con el lisosoma generándose el autofagolisosoma lo que permite la

degradación de la membrana y su contenido por las enzimas lisosomales (figura 2.12) [202].

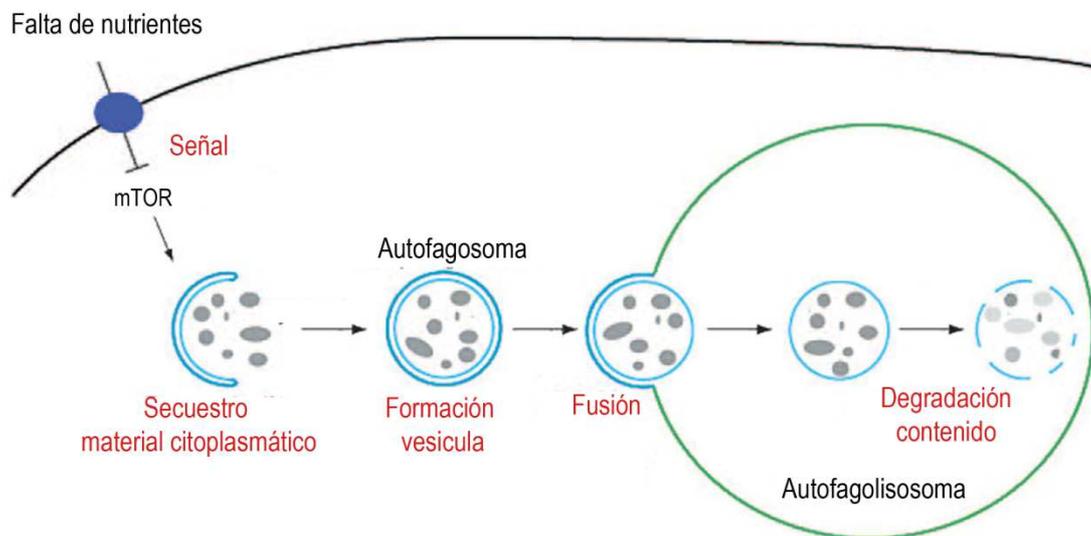


Figura 2.12: Autofagia. La autofagia tiene lugar en condiciones de falta de nutrientes. Consiste en el secuestro de material citoplasmático por una doble membrana formando el autofagosoma, que se fusionará con un lisosoma con el fin de su degradación. Adaptado de [203]

2.1.4. Piroptosis

Es una forma de muerte celular reconocida recientemente con características morfológicas y bioquímicas diferentes de la apoptosis y la necrosis [204]. La piroptosis se ha observado en monocitos, macrófagos [205] y células dendríticas infectadas [206], en los cuales se activa la caspasa 1 con la formación del inflamasoma, complejo equivalente al apoptosoma en la activación de la caspasa 9 [207, 208].

La caspasa-1 es una caspasa pro-inflamatoria necesaria para la maduración de IL-1 β e IL-18 [209, 210], citoquinas que inducen inflamación. Por lo que la piroptosis es un tipo de muerte desencadenada por una respuesta inflamatoria que se ve amplificada por la liberación del contenido citoplasmático cuando se lisa la célula al morir [211].

La morfología de la piroptosis no queda muy clara todavía. Se observa caída de potencial mitocondrial y condensación nuclear como en la apoptosis, pero se pierde la integridad de la membrana plasmática como en necrosis [212, 213].

2.2. Nanotecnología

La nanotecnología ha ido cobrando más y más fuerza en las últimas décadas, tanto en el ámbito científico como en la vida cotidiana, ayudando a solucionar muchos problemas en los más diversos campos.

En 1959 el físico Richard Feynman [214] introdujo por primera vez la posibilidad de trabajar a escala nanométrica en su famoso discurso "There's plenty of room at the bottom". Esta fue la primera visión de las posibilidades de la ciencia y la tecnología a escala nanométrica. El término "nanotecnología" fue usado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi de la Universidad de Tokio. Sin embargo, la nanotecnología no se convirtió en una verdadera revolución hasta la década de los 80 con el descubrimiento de técnicas como la microscopía de efecto túnel (STM) por Binnig y Rohrer [215] y materiales como el fullereno [216].

El término nanotecnología ha sido definido por el NNI ("National Nanotechnology Initiative") como la parte de la ciencia que comprende las técnicas y herramientas para la creación y utilización de sistemas, estructuras y materiales que tengan, al menos una de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nm. Recientemente la Comisión Europea ha sugerido la introducción de materiales sintéticos o naturales que contengan partículas dispersas, agregados o aglomerados siempre que más del 50% de las mismas cumplan las condiciones establecidas por el NNI.

2.2.1. Relevancia de los nanomateriales

La relevancia de los nanomateriales reside en la diferencia en su comportamiento respecto a sus homólogos a nivel macroscópico. Esto es debido a su tamaño, grado de ordenación y sus interacciones.

Al reducir a escala nanométrica los materiales con los que se construyen las nanopartículas se produce un aumento del ratio superficie/volumen. De esta forma aumenta el porcentaje de átomos o moléculas presentes en la superficie respecto del total, lo que hace que haya más grupos reactivos y altera las propiedades electrónicas [217]. Este efecto conlleva la aparición de nuevas o mejoradas propiedades químicas y/o físicas (ópticas, magnéticas, térmicas, eléctricas, etc.) [218]. Además, el rango de tamaño en el que se presentan las nanopartículas es en el que ocurren la mayoría de interacciones físicas o químicas (figura 2.13).

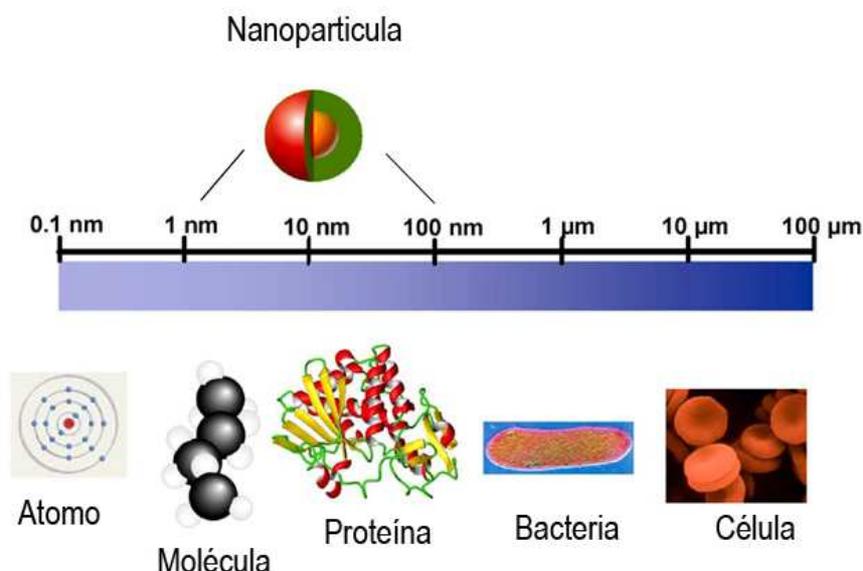


Fig 2.13: Tamaño de las nanopartículas en relación a otros componentes biológicos [219].

Según el método de síntesis utilizado, variando la forma, tamaño y estructura de los nanomateriales, podemos influir en sus propiedades. Es decir, podemos sintetizar nanopartículas con propiedades específicas que se puedan aplicar en el campo de la industria y la medicina. Además, se están desarrollando nanomateriales con varias aplicaciones como por ejemplo, en el campo de la nanomedicina, aquellos que permiten el diagnóstico y el tratamiento simultáneamente.

Es por todo ello que la nanotecnología presenta un gran potencial para un sinnúmero de aplicaciones en diversos campos como en la informática, microelectrónica, comunicaciones, diseño de nuevos fármacos o control medioambiental entre otros (figura 2.14). La variedad de aplicaciones que son posibles con el desarrollo de la nanotecnología ha incrementado su uso y hacen que sea comparable con las consecuencias de la revolución industrial [220].



Figura 2.14: Algunas aplicaciones de la nanotecnología. Adaptado de Tsuzuki [220]

2.2.2. Descripción de las nanopartículas (NPs)

El término nanopartícula (NP) hace referencia a distintos nanomateriales tanto inorgánicos como orgánicos o incluso una mezcla de ambos. Las propiedades de estas NP vienen determinadas por muchos factores [221]. Los principales son:

- **Composición química del núcleo:** Distinguiendo las NPs de naturaleza orgánica (liposomas, polímeros) o inorgánica. Es el factor más determinante en las propiedades de la NP. Según el compuesto utilizado, el sistema poseerá alta densidad electrónica e intensa absorción óptica (oro, plata, cobre) [222], momento magnético (óxido de hierro o cobalto) [223], fosforescencia (óxidos dopados) [224], etc.

Una vez seleccionado el material se pueden modular dichas propiedades mediante la variación de otros parámetros [225] como:

- **Forma:** esferas, prismas, cubos, estrellas, cilindros, etc [226].

- Tamaño: entre 1 y 100 nm.
- Medio de dispersión: pueden ser estables en fase orgánica o acuosa, según el método de síntesis y tratamientos posteriores [224].
- Estado de dispersión: dispersas, aglomeradas o agregadas.
- Ligandos en la superficie de naturaleza diversa pueden ejercer de estabilizantes, modificar la solubilidad, variar la carga neta, etc. Estos ligandos pueden estar unidos mediante enlaces covalentes, de coordinación o interacciones electrostáticas, directamente a la superficie de la nanopartícula (núcleo) o a otras moléculas que actúan de espaciadores [227].

2.2.3. Nanopartículas en medicina: Nanomedicina

La nanomedicina se define como la rama de la medicina que utiliza nanomateriales para aplicaciones biomédicas como diagnóstico (nanodiagnóstico) y tratamiento de enfermedades (nanoterapia), pudiendo combinarse ambas bajo el término de teragnóstico "theragnostic". De esta forma se puede diagnosticar la enfermedad, tratar y monitorizar el tratamiento permitiendo conocer rápidamente su efectividad [228].

Los nanomateriales son muy interesantes para la biomedicina. Debido al rango de dimensiones en el que se presentan, son ideales para su uso a nivel celular ya que pueden interactuar con biomoléculas (carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas, etc.). Además, como presentan una elevada superficie (al aumentar la relación superficie/volumen) permiten la unión de diversos ligandos, de esta manera se aprovechan no solo las propiedades de la NP sino también las que proporcionan estas moléculas (catalíticas, especificidad, etc) lo que convierte a estos sistemas en plataformas multifuncionales [8].

La unión de ligandos a la NP permite entre otras, imitar la superficie externa de las células generando mayor afinidad y mejorar el reconocimiento de las células diana. Por ejemplo, al recubrirlas con carbohidratos que asimilan el glicocalix [219]. También aumenta la especificidad al utilizar ligandos que dirijan la NP a tejidos o células diana, de esta manera se pueden utilizar como vehículo para el transporte de drogas o para el diagnóstico [9, 229]. Incluso se pueden utilizar para estudiar los mecanismos naturales de interacción en los procesos de reconocimiento celular [219, 230].

La nanotecnología aplicada a la nanomedicina pretende resolver muchos de los problemas que actualmente existen, como el diagnóstico temprano, mayor

sensibilidad o disminuir los límites de detección, efectividad de tratamientos y reducir sus efectos secundarios.

2.2.3.1. Nanopartículas para el diagnóstico: Nanodiagnóstico

El nanodiagnóstico desarrolla diferentes tipos de biosensores para un sinnúmero de analitos [231] y marcadores tumorales [232]. El uso de NPs para el diagnóstico supone un aumento en la sensibilidad gracias a la utilización de diversas técnicas.

La sensibilidad se ve aumentada debido a la gran cantidad de ligando utilizado como elemento de reconocimiento, expuesto en la superficie de la NP. Además, la introducción de nuevas propiedades físicas permiten su análisis de forma más precisa. Mínimas variaciones en las propiedades ópticas o magnéticas se traducen en cambios importantes de la señal correspondiente, llegando a detectar concentraciones de varios órdenes de magnitud por debajo de los obtenidos por métodos tradicionales [233].

Así mismo, algunos tipos de NPs presentan grandes cualidades como agentes de contraste en técnicas como la resonancia magnética de imagen (MRI) [234] o la tomografía computarizada (CT) [235] o fluorescente entre otras [236].

2.2.3.2. Nanopartículas en la terapia: Nanoterapia

La nanoterapia permite utilizar NPs como vehículos transportadores de moléculas bioactivas (drogas, RNA, DNA, etc.), o utiliza las propias características de las NPs como terapia.

Por una parte, utilizar las NPs como transportadores permite la liberación de forma controlada de la molécula transportada mediante cambios químicos o físicos como variaciones en el pH o temperatura. Esto permite el transporte selectivo de fármacos para terapia antitumoral, o de ácidos nucleicos en la terapia génica, para modificar la expresión de proteínas a nivel celular [237, 238].

También se puede utilizar la capacidad que poseen determinados tipos de NPs de generar calor en presencia de un campo magnético (hipertermia magnética) [239] o tras irradiación con luz a una determinada longitud de onda (hipertermia óptica) [240]. Este calor permite un aumento en la temperatura local que se traduce en la muerte de las células o en la liberación de la molécula transportada en la NP.

Los agentes quimioterapéuticos convencionales se distribuyen de forma no selectiva por el organismo y afectan tanto a células sanas como tumorales, lo que limita la dosis por su alta toxicidad. Uno de los grandes avances de la nanoterapia es que se pueden dirigir los fármacos a las zonas de interés, aumentando así la selectividad del tratamiento pudiendo reducir la dosis y los efectos secundarios y aumentar la eficacia. Además resuelve problemas de solubilidad y permite modificar la vía de administración [241]. Por todo ello, la nanoterapia abre la puerta al uso de fármacos descartados por su imposibilidad de atravesar membranas biológicas, o por ser poco solubles en medio fisiológico o inestables.

2.2.4. Tipos de nanopartículas

Existen diferentes tipos de NPs clasificadas en función de la composición del núcleo. Pueden ser orgánicas, como las NPs poliméricas o los liposomas, o de naturaleza inorgánica entre las que encontramos las NPs magnéticas o de oro.

2.2.4.1. *Nanopartículas poliméricas*

Es uno de los tipos de NPs más empleados en el transporte de fármacos, de manera que podemos encontrar varios ensayos clínicos que utilizan este tipo de NPs para el transporte de drogas o agentes quimioterapéuticos [242, 243] (www.clinicaltrials.gov).

Dependiendo del método de síntesis, la droga está encapsulada o unida covalentemente a un polímero o a una mezcla de varios. Los polímeros más habituales son el polietilenglicol (PEG) (polímero sintético no degradable) [244], el óxido de polietileno (PEO), el ácido poliacrílico (PAA), la hidroxipropil metacrilamida (HPMA) [245], o el ácido poliglutámico (PGA) (polímero sintético degradable) [246-248], entre otros. Estos polímeros aumentan el tiempo de vida de la droga en la circulación sanguínea y la acumulación en los tumores por el efecto EPR ("enhanced permeability and retention") [249].

La elección del polímero modula las características de la NP, como por ejemplo la carga neta [250].

Dentro de las NPs poliméricas podemos diferenciar las **micelas** poliméricas, que utilizan copolímeros para formar un núcleo hidrofóbico que sirva de reservorio de drogas hidrofóbicas, pero con una cubierta hidrofílica que permite su solubilidad en agua. De esta manera permite la posibilidad de utilizar drogas descartadas por problemas de solubilidad, así como su administración por vía intravenosa [242, 251].

Otro tipo de NPs poliméricas son los **dendrimeros**, que consisten en una macromolécula polimérica compuesta por varios monómeros ramificados desde el núcleo. Las cavidades internas que quedan, se utilizan para el transporte de drogas [252].

2.2.4.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas formadas por bicapas lipídicas de forma análoga a las membranas celulares. La importancia de los liposomas reside en su versatilidad y plasticidad, seleccionando su composición lipídica, carga y tamaño se pueden modular sus características. Permiten tanto la encapsulación de moléculas hidrofílicas en su interior, como la unión de moléculas hidrofóbicas a los fosfolípidos [253].

De esta manera es posible el transporte de drogas, aumentando el tiempo que permanecen en circulación y su captación por parte de las células tumorales. La primera NP aprobada por la FDA para su estudio en investigación clínica en 1995 fue DOXIL, doxorubicina encapsulada en un liposoma cubierto por PEG [254].

La plasticidad de los liposomas los hacen interesantes para todas aquellas aplicaciones que requieran la oligomerización de receptores y activación de señales en las células diana, como en la inducción de apoptosis a través de ligandos mortales [255, 256]. También son interesantes como vacunas, ya que además de transportar antígenos y adyuvantes, favorece la activación de la respuesta inmune. La fagocitosis de los liposomas por las células presentadoras de antígeno, permite su activación y la consecuente activación de las células T. La plasticidad de los liposomas permite la coagregación del receptor de células B y por lo tanto la activación de estas células [257].

Por otro lado, la unión de moléculas hidrofóbicas a los fosfolípidos también permite su uso para neutralizar toxinas [258].

2.2.4.3. Nanotubos de carbono

Son estructuras cilíndricas pertenecientes a la familia de los fullerenos, formados únicamente por átomos de carbono dispuestos de manera hexaédrica. Se subdividen en dos grandes grupos en función de si presentan una sola capa de átomos o varias. Su característica principal es poseer una gran resistencia y ser eficientes conductores eléctricos y térmicos [259, 260].

2.2.4.4. Quantum dots (QDs)

Son nanocristales semiconductores de entre 2 y 10 nm cuyo núcleo consiste en una combinación de elementos como CdSe, CdS, PbSe, GaAs, etc, recubiertos de una capa formada por una aleación, como ZnS. Su característica principal es que son fluorescentes, con bandas estrechas de emisión, cuya longitud de onda máxima depende de su composición y tamaño (figura 2.15). Se pueden excitar con cualquier longitud de onda por debajo de la de emisión, por lo que con un solo laser se pueden excitar varios nanocristales y analizar de forma simultánea la emisión de fluorescencia a distintas longitudes de onda [261]. Tienen un elevado rendimiento cuántico (de varias órdenes de magnitud superior a los fluoróforos tradicionales) y presentan una gran estabilidad frente a la degradación por la luz o agentes químicos. Por ello son excelentes como agentes de contraste para imagen y transductores de señal en bioensayos [262].



Figura 2.15: Quantum dots. Fotoluminiscencia de quantum dots de 6nm de diámetro CdS_xSe_{1-x}/ZnS. El material emite diferente color variando su composición y tamaño. (Sigma-Aldrich)

2.2.4.5. Nanopartículas magnéticas (MNPs)

Las MNPs están formadas por un núcleo de hierro, níquel, manganeso, cobre, o algún derivado. Su interés radica en sus propiedades magnéticas. Los más utilizados en aplicaciones biomédicas son aquellas cuyo núcleo se compone de magnetita o maghemita debido a su menor toxicidad. Este tipo de nanopartículas pueden utilizarse para el transporte de fármacos guiados por un imán (magnetofección) [263], como agentes de contraste [264], o para generar calor, ya sea para tratamiento por hipertermia o para la liberación de fármacos, lo que se consigue con la aplicación de un campo magnético [239].

2.2.4.6. Nanopartículas de oro (AuNPs)

Presentan un núcleo de oro gracias al cual poseen unas propiedades ópticas y químicas que las hacen muy útiles para aplicaciones biomédicas [265]. De este tipo de nanopartículas se hablará en mayor extensión a continuación.

También es posible la combinación de distintos tipos de NPs en sistemas híbridos aprovechando las ventajas aportadas por cada uno de ellos, por ejemplo, en el desarrollo de los sensores tipo sándwich [266].

2.2.5. Estructura de las NPs inorgánicas

Existen una serie de factores que restringen el uso de muchos materiales en nanomedicina. Para que un nanomaterial sea el candidato ideal es necesario que sea soluble en medio acuoso, biocompatible, "invisible" al sistema inmune, que llegue al lugar de acción y que atraviese las membranas biológicas.

Para poder cumplir con todos estos requerimientos, es necesario diseñar cuidadosamente el sistema, ya que aspectos como la forma, el tamaño y la carga neta tienen gran influencia en el comportamiento del material [267]. Además, al ser plataformas multifuncionales se pueden unir diversas moléculas que ayuden a superar cada uno de los obstáculos. Por ejemplo, el tamaño de las NPs tiene que ser suficientemente grande para evitar que escapen de la circulación sanguínea y suficientemente pequeño para que no sean fagocitadas por los macrófagos. Las NPs más grandes se acumulan en áreas menos vascularizadas como es el caso de los tumores mientras que las más pequeñas (menos de 5 nm) son más fácilmente excretadas [268].

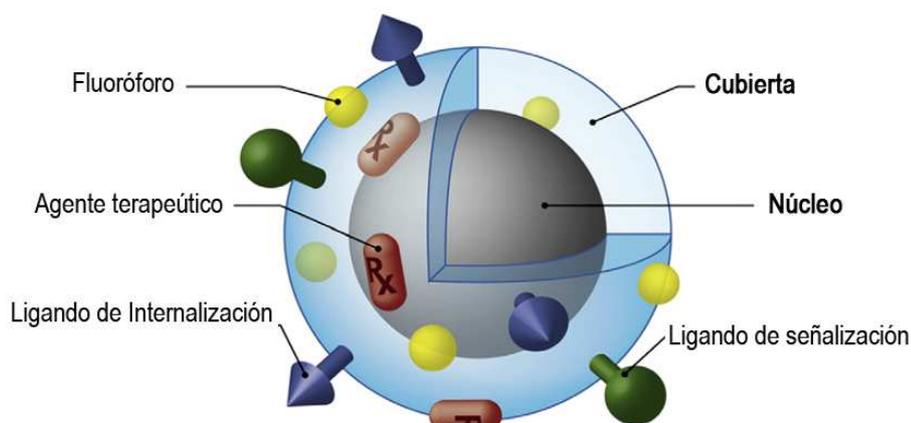


Figura 2.16: Estructura de una nanopartícula inorgánica. Plataforma multifuncional [269].

Concretamente, las NPs inorgánicas suelen presentar una estructura formada por tres componentes: núcleo, cubierta y biomoléculas o ligandos de interés (figura 2.16).

El **núcleo** aporta a la NP una serie de propiedades específicas que dependen del material utilizado. Pero por sí solo, el núcleo es muy reactivo e inestable.

Para evitar efectos no deseados como la adsorción de proteínas o generación de ROS, tras la síntesis se recubre el núcleo con una **cubierta**. Esta cubierta suele estar compuesta de un material poroso (sílica) [270] o de naturaleza polimérica [269], que además de estabilizar el sistema facilita la conjugación posterior de ligandos. De esta forma se evita la oxidación y corrosión del núcleo, la agregación [271] y se favorece la solubilidad en disolventes acuosos, lo que es necesario para aplicaciones biomédicas [272]. El PEG [273] es el material más utilizado para este fin, ya que debido a su naturaleza hidrofílica inhibe la adsorción de proteínas del plasma (opsonización) y por lo tanto el reconocimiento de la NP por parte del sistema inmune de forma que aumenta su tiempo medio de vida en sangre y puede llegar al tejido diana [274, 275].

A esta cubierta se pueden unir **biomoléculas** y otros **ligandos** de interés, como péptidos de internalización que faciliten la captación de las NPs por parte de la célula [276, 277], anticuerpos que la dirijan a un tejido u órgano específico [278, 279], drogas [280], marcadores fluorescentes [281], ácidos nucleicos [282], etc.

Estas moléculas pueden estar unidas directamente al núcleo de la NP o a la cubierta. Los métodos de unión pueden dividirse en interacciones electrostáticas (susceptibles al pH y la fuerza iónica) [283], enlace covalente (fuerte y estable frente a los cambios en el medio) [284], enlace de afinidad (una de las interacciones no covalentes más estables que se conocen) [285], o quimisorción (enlace cuasi-covalente directamente a los átomos del núcleo) [286].

2.2.6. Nanopartículas de oro (AuNPs)

El oro ha sido muy valorado desde su descubrimiento, los alquimistas siempre han pensado en el oro como indestructible y con valor medicinal, ya en el S.VII se utilizaba cloruro de oro para purificar la sangre. El primer uso del oro en la medicina moderna se debió a Robert Koch al descubrir las propiedades antibacterianas de la sal de cianuro [287]. Actualmente se conocen compuestos

de oro con propiedades antiartríticas, anti-malaricas y anti-cancerígenas [288-290].

Las AuNPs tampoco son un invento de la nanociencia. El primer estudio científico de nanopartículas de oro puede que se deba a Michael Faraday que en 1857 sintetizó los primeros coloides de oro. Observó que las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro (color) eran dependientes de su tamaño [291] y que las partículas a escala nanométrica tienen un comportamiento diferente al de la escala macrométrica, todo ello un siglo antes de la aparición de la nanotecnología [292].

Las AuNPs están dentro de las más estudiadas debido a su gran estabilidad, baja toxicidad y la alta eficiencia que presentan en la generación de calor, combinado con la multitud de métodos de síntesis que generan una amplia variedad de formas y estructuras [293]. Así mismo se pueden funcionalizar con moléculas mediante su unión a través de distintos grupos funcionales. Presentan por lo tanto multitud de aplicaciones, desde el diagnóstico, terapia génica, el transporte de drogas, inmunoterapia, terapia fototérmica y radioterapia [294].

2.2.6.1. Propiedades ópticas

Una de las características más importantes de las AuNPs son sus propiedades ópticas. Al igual que los metales nobles, plata y cobre, presentan bandas de absorción en un rango de longitudes de onda desde el visible al infrarrojo cercano (NIR). Estas propiedades ya las usaban los romanos en cuanto a estética para colorear el cristal, como en el caso de la copa Lycurgus (figura 2.16). Pero fue Mie en 1908 quien relacionó el color de las partículas coloidales con su tamaño [295]. Lo que posteriormente fue interpretado como el efecto de resonancia de plasmón de superficie.

Los electrones de la superficie de una nanoestructura metálica oscilan de forma colectiva cuando la nanopartícula es irradiada a una longitud de onda determinada. Esto se conoce como plasmón de superficie y se traduce en la generación de intensos campos electromagnéticos que pueden interactuar con moléculas en la superficie o cerca del metal. El plasmón de superficie puede ser detectado como picos en el espectro de absorción de la nanopartícula, dando lugar a unas bandas conocidas como banda de plasmón de superficie, donde la nanopartícula absorbe. La longitud de onda de esta banda de plasmón de superficie depende del tamaño [296], composición y geometría de las AuNPs [297] (figura 2.17).



Fig. 2.16: Copa Lycurgus. The Lycurgus Cup 1958,1202.1. S.IV a.C Efecto dichroísmo debido al uso de nanopartículas de oro [298].

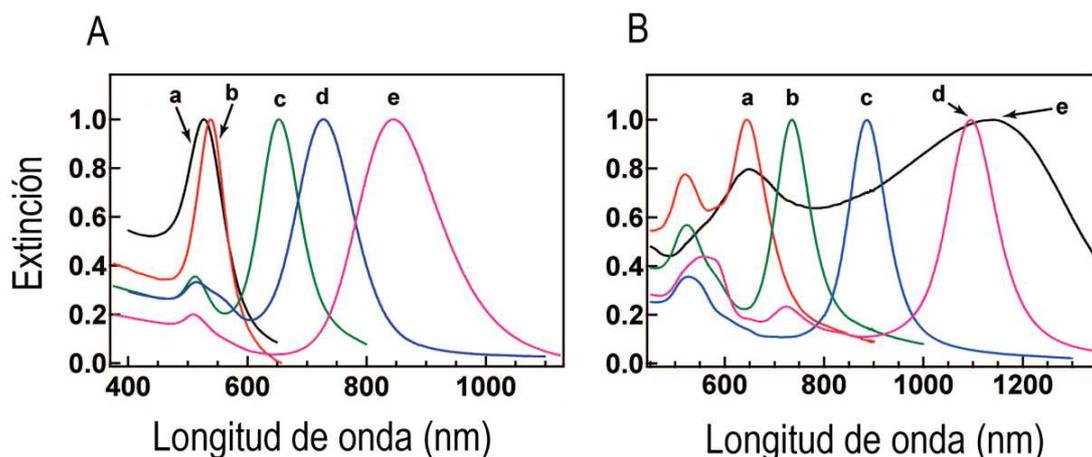


Figura 2.17: Espectros de absorción normalizados de nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños. (A) corresponde a (a) nanoesferas, (b) nanocubos, (c-e) nanocilindros de ratio 2.4 ± 0.3 , 3.4 ± 0.5 , 4.6 ± 0.8 respectivamente. (B) corresponde a (a-d) nanobipirámides de ratio 1.5 ± 0.3 , 2.7 ± 0.2 , 3.9 ± 0.2 y 4.7 ± 0.2 respectivamente y (e) nanopartículas en rama [297].

La localización de esta banda en el NIR ("Near Infrared") es muy importante en biomedicina debido a que los tejidos biológicos son transparentes a estas longitudes de onda, con mínima absorción por parte del agua y la hemoglobina, por lo que irradiaciones en NIR tienen gran penetrancia en tejidos biológicos [299]. Por ello, una de las aplicaciones de las AuNPs es su uso en imagen. Además, presentan coeficientes de extinción molar varios órdenes de magnitud por encima de las moléculas orgánicas, por lo que se han utilizado como agentes de contraste sustituyendo a la malaquita verde y rodamina-6G [300].

La posición de la banda de plasmón de superficie también depende de la distancia entre las NPs, grado de agregación, unión de moléculas a su superficie, índice de refracción y la constante dieléctrica del medio [301]. Por lo que otra de las aplicaciones de las nanopartículas de oro y plata es su uso como biosensores, permitiendo la detección de multitud de sustancias biológicas como DNA, RNA, proteínas [302], toxinas o iones metálicos a concentraciones realmente bajas [303].

Por otro lado las AuNPs tienen la habilidad de convertir la luz absorbida en calor (fototermia). Este calor se puede utilizar en imagen, ya que permite la obtención de un mapa de distribución de la temperatura, con 1K de diferencia [5]. También se puede utilizar el calor para terapia al permitir la liberación de drogas u otros agentes terapéuticos [3] o produciendo la muerte de la célula por incremento de la temperatura [1]. Esta última aplicación es uno de los temas que hemos tratado en el desarrollo de esta tesis.

2.2.6.2. Síntesis de AuNPs

En los últimos años se han descrito multitud de métodos de síntesis de AuNPs, con formas y tamaños muy diversos, siendo posible la obtención de nanoprismas, nanocilindros, nanocubos y nanoesferas entre otros, con buena reproducibilidad y dispersión adecuada. Como la geometría de las AuNPs influye en las propiedades ópticas del nanomaterial, esta gran variedad de formas permite seleccionar la más adecuada en cada caso.

La síntesis de AuNPs se puede realizar mediante dos técnicas:

2.2.6.2.1. Métodos físicos

Consiste en producir AuNPs mediante la ruptura del oro a escala macrométrica mediante una gran fuerza como irradiación iónica, termólisis, UV o láser [304]. No es una técnica muy usada ya que es muy difícil controlar el tamaño y la forma de las AuNPs, así como su dispersión.

2.2.6.2.2. Transformación química

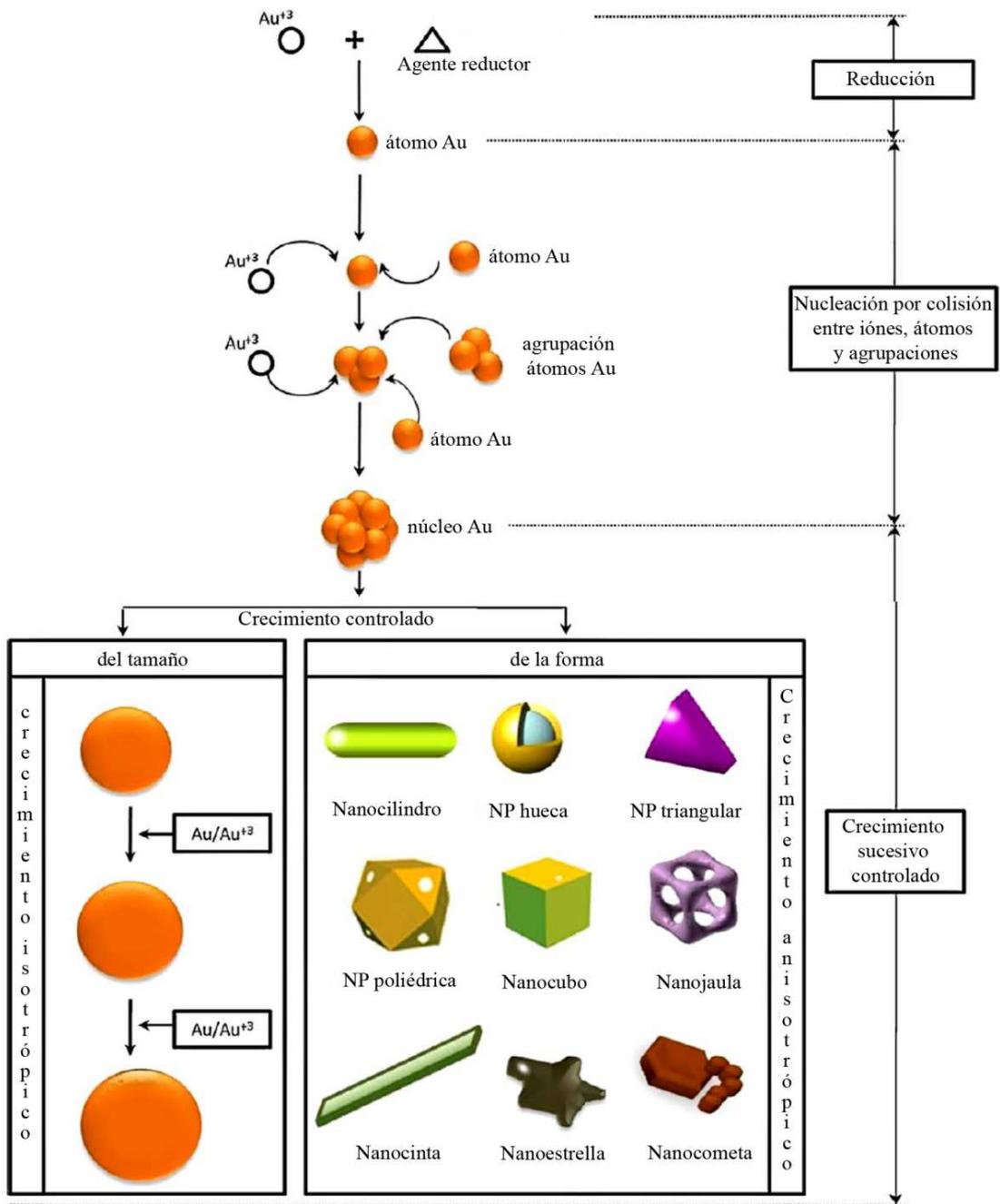


Figura 2.18: Síntesis de AuNPs mediante reducción de sal de oro. La síntesis se produce en dos pasos, nucleación y crecimiento controlado, de manera que se pueden obtener un gran número de formas y tamaños. Adaptado de Nguyen [305]

La **nucleación** consiste en colisiones entre iones, átomos de Au y agrupaciones de éstos, lo que genera partículas precursoras llamadas semillas ("seeds"). Posteriormente se produce el **crecimiento** de estas semillas tanto a nivel isotrópico (aumento de tamaño), en el cual los nuevos átomos de Au se depositan en la superficie de éstas, como anisotrópico (forma) para lo que se añade algún surfactante que bloquea el crecimiento en diferentes direcciones [305] (figura 2.18).

La modificación del tipo de agente reductor así como del número de pasos en los que se adiciona [306], el tiempo de reacción, concentraciones [307], pH [308], etc, da lugar a una amplia variedad de NPs en cuanto a su tamaño y forma [309] y por lo tanto en cuanto a sus propiedades químico-físicas. De esta manera se obtienen AuNPs monodispersas y de geometría controlable.

Para evitar la aglomeración de las partículas es necesario estabilizarlas. Hay dos modos de estabilización, uno basado en repulsiones electrostáticas entre las partículas y el otro en repulsiones estéricas, para lo cual se unen moléculas orgánicas a la superficie metálica de las partículas que la protegen. Esto se lleva a cabo durante el proceso conocido como funcionalización.

2.2.6.3. Funcionalización

Las AuNPs son muy inestables en condiciones fisiológicas, forman agregados, lo que favorece su rápida eliminación del organismo. La funcionalización de las NPs con una cubierta de moléculas biocompatibles, entre las que se encuentra el PEG, proporciona una mayor dispersión y estabilidad dotando a la NP de propiedades biocompatibles.

Para la funcionalización es necesario unir las moléculas biocompatibles a la AuNP. Para ello se utilizan distintos grupos reactivos como aminas (-NH₂) [310] y fosfinas (PH₂) [311]. Sin embargo la interacción más utilizada es la que se establece entre átomos de oro de la superficie de la AuNP y azufres de grupos tiol (-SH) presentes en las moléculas con las que se quiere recubrir la AuNP [312]. El enlace que se genera (S-Au) es fuerte (algunos autores lo consideran covalente o cuasi-covalente) y permite una rápida y eficiente funcionalización de forma sencilla [313]. De esta forma se puede utilizar un polímero biocompatible para cubrir la NP mediante enlace S-Au, que además de estabilizar permite la unión de la AuNP y los diversos ligandos de interés (DNA, drogas, anticuerpos, etc.) mediante enlaces covalentes o iónicos [314]. Para ello se ha estudiado un gran número de grupos terminales (incluidos grupos hidroxilo, carboxilo o aromáticos) con el fin de modificar la superficie de la NP y favorecer la unión de los ligandos (figura 2.19) [224].

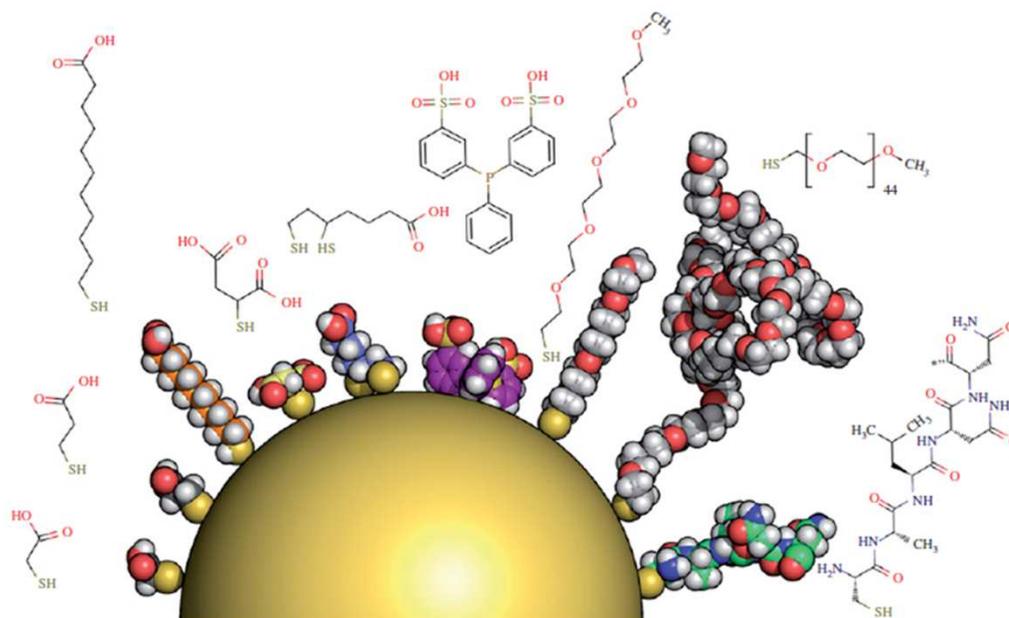


Figura 2.19: Funcionalización de AuNP. Recubrimiento del núcleo de la AuNP con un polímero biocompatible mediante enlace S-Au. Estos polímeros pueden presentar diferentes grupos funcionales para su unión a distintos ligandos [224].

2.2.7. Toxicidad

Las propiedades y características únicas de los nanomateriales los hacen potencialmente interesantes para el desarrollo de la nanomedicina inteligente; tratamiento personalizado, diagnóstico precoz, medicina preventiva, "theragnostic", etc. Además, las NPs no se usan únicamente en medicina, sino también en cosmética, tecnología, electrónica, etc, por lo que estamos expuestos a los nanomateriales sin darnos cuenta. Debido a ello existen multitud de estudios de toxicidad de las NPs tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque es ahora cuando ha alcanzado mayor interés. La nanomedicina es un campo en desarrollo, sin embargo antes de poder ser aplicada es necesario que se establezca una regulación y unos protocolos de nanoseguridad en cuanto a su manipulación o exposición accidental.

El peligro de las NPs se debe a su pequeño tamaño, ya que pueden interactuar con sistemas biológicos y el medioambiente con el potencial de generar toxicidad. Las NPs pueden distribuirse en el aire o en la tierra, ser digeridas por bacterias y pasar a la cadena alimenticia [315, 316]. El contacto con las NPs se puede producir por inhalación, ingestión, inyección o a través de la piel. Se ha observado que los nanomateriales viajan por el organismo, se depositan en órganos diana, pueden interactuar con proteínas, traspasar membranas celulares, incluso las más pequeñas pueden penetrar en el núcleo

y unirse al DNA, traspasar la barrera hematoencefálica o la placenta, etc. Lo que puede desencadenar efectos dañinos que no tendría el material en escala macrométrica. Además existe la posibilidad de que las características de las nanopartículas se modifiquen con su exposición a radiación UV o por su agregación y por lo tanto tengan un comportamiento inesperado.

Tras la administración o exposición accidental las NPs entran en contacto con las proteínas séricas. Las propiedades fisico-químicas de las NPs modulan la interacción con estas proteínas [317], que influye en la distribución de las NPs, biocompatibilidad e incluso el efecto terapéutico [318]. Aunque la distribución de las NPs también depende de las características de la vasculatura de cada tejido y órgano [319]. En los órganos, las NPs son captadas por las células o macrófagos por lo que son eliminadas de la circulación sanguínea. En algunos órganos, la extravasación de las NPs está restringida por barreras naturales (barrera hematoencefálica o placenta), que son traspasadas en algunos casos con sus consecuentes efectos tóxicos no deseados [320]. La internalización de las NPs por parte de la célula, el tráfico intracelular y el destino final de éstas, depende de las características de las NPs, lo que es muy importante tanto para desempeñar su función como para su toxicidad. Una vez en la célula las NPs puede sufrir procesos metabólicos que pueden degradarlas y pueden ser eliminadas a través de la orina o las heces [321]. Sin embargo, algunas NPs permanecen en los órganos por largos periodos de tiempo, pudiendo alterar el funcionamiento del órgano o tejido, induciendo toxicidad crónica, toxicidad metabólica, inmunotoxicidad [38] o incluso genotoxicidad [322]. Por lo tanto, para minimizar los riesgos que las NPs suponen para la salud, es necesario estudiar en profundidad su potencial tóxico (figura 2.20).

Uno de los mecanismos más frecuentemente sugeridos implicados en la toxicidad de las NPs metálicas es la generación de ROS y el estrés oxidativo. Se consideran marcadores toxicológicos porque alteran la función mitocondrial lo que genera la salida de factores apoptogénicos [323], producen inflamación, daño en el DNA [324], proteínas y lípidos y por lo tanto dañan células y tejidos [324, 325]. El aumento del área de la superficie de la NP aumenta su capacidad oxidativa masiva, que puede producirse por diferentes mecanismos como la acidificación del entorno (localización de las nanopartículas en los lisosomas) [326], interacción de las nanopartículas con la mitocondria, interacción con proteínas como NADPH oxidasa o con receptores en la superficie celular que activan rutas de señalización [327].

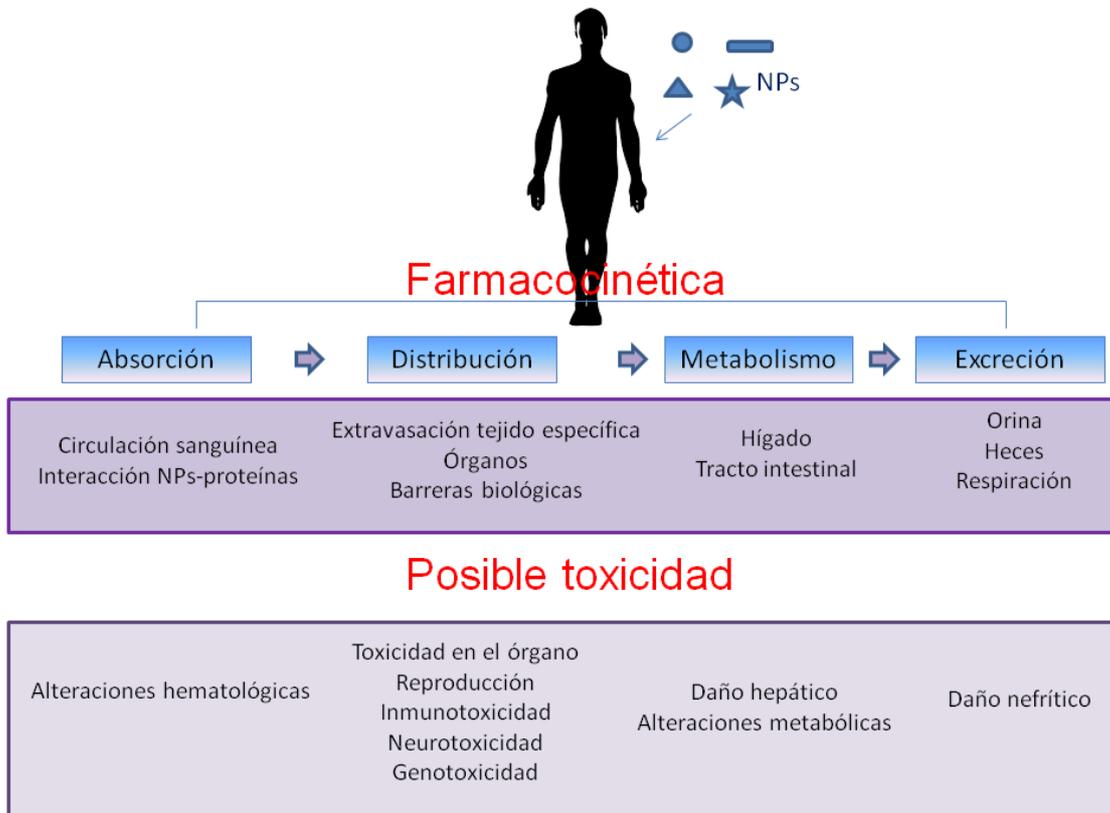


Figura 2.20: Farmacocinética y toxicidad de las NPs [37].

Las NPs también pueden interactuar con proteínas del citoesqueleto cuyo papel en el mantenimiento de la morfología celular y las rutas de señalización es bien conocido y está relacionado con la muerte celular, proliferación, migración y diferenciación [328].

Es posible que las NPs no sean tóxicas para la célula en la que se encuentren, en cuanto a que produzcan su muerte, sin embargo pueden alterar su funcionamiento. Se ha visto que NPs fagocitadas por células dendríticas (DC) no producen la muerte de estas células, pero sí que afectan a la secreción de IL-12, una citoquina importante en la activación de otras células del sistema inmune necesarias para la eliminación de células infectadas o tumorales [38].

Por otro lado, la toxicidad no solo depende de las características de las NPs, también puede deberse a un exceso de los reactivos utilizados en su síntesis [329-331].

Como podemos ver, la multitud de efectos que puede desencadenar el contacto con NPs es inmenso. Si a esto le añadimos la diversidad de nanopartículas sintetizadas, en cuanto a composición, forma y tamaño y la falta de datos sobre exposición a ellas, hacen compleja la regulación de la nanotecnología constituyendo un riesgo para la salud humana.

Un buen estudio de la toxicidad de las NPs, engloba la caracterización de las NPs y estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (figura 2.21). Los aspectos tóxicos de las NPs pueden deberse a su inestabilidad en ambientes biológicos. En cultivos celulares suelen producir ROS, por lo que se ha sugerido como el mejor parámetro para determinar la toxicidad *in vitro*, junto con ensayos de muerte celular, parada del ciclo celular o daño en el DNA. Sin embargo, son necesarios estudios en modelos animales para analizar la biodistribución y poder establecer realmente la seguridad de las NPs.

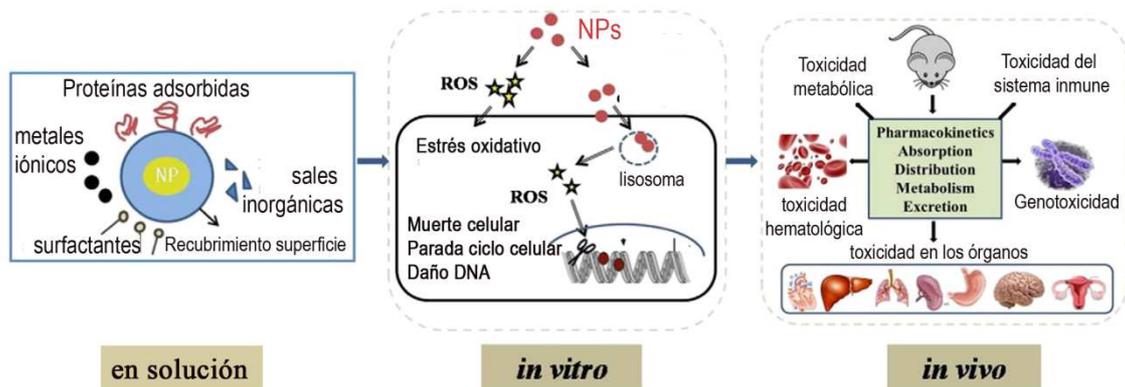


Figura 2.21: Estudio toxicológico de NPs. Es necesario un estudio del comportamiento de las NPs en solución, sus efectos sobre células *in vitro* y finalmente un estudio de farmacocinética y toxicidad *in vivo*. [37]

2.2.8. Hipertermia como tratamiento para el cáncer

El término hipertermia en oncología, hace referencia a varias técnicas de aplicación de calor en el tratamiento del cáncer. Podemos distinguir entre hipertermia local y regional, en la que se incrementa la temperatura de una zona, de la hipertermia general en la que se aumenta la temperatura del cuerpo completo. El calor produce alteraciones en el microambiente tumoral, transducción de señales y disminuye la resistencia a drogas [332]. La eficacia aumenta de forma exponencial con la temperatura. Sin embargo, altas temperaturas conllevan consecuencias catastróficas y la muerte celular de forma rápida. Una de las razones es la desnaturalización de las proteínas.

La hipertermia como tratamiento lleva años en estudios clínicos. Tradicionalmente estos tratamientos se llevaban a cabo con equipos externos que transferían calor durante 30-60 minutos a las células tumorales, como ultrasonidos, microondas [333], irradiación en el infrarrojo, o agua caliente [334]. Sin embargo, estas técnicas presentan numerosas limitaciones, como

baja penetrancia, poco control de la temperatura, excesivo calentamiento del tejido sano o disipación del calor por la circulación sanguínea. Aunque se han ido mejorando, en la medida de lo posible con el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten un control de la temperatura mucho más preciso [335].

Desde los años 70 junto con los ensayos clínicos, se han llevado a cabo multitud de estudios pre-clínicos aumentando la temperatura entre 41 y 47°C. Estos estudios han mostrado variedad de efectos, dependiendo del tipo de tumor, línea celular, citostático con el que se combina, tiempo que se mantiene la temperatura alta, etc [336, 337], observándose un incremento de la eficacia a partir de 43°C. La hipertermia suave (40-43°C) provoca aumento del flujo sanguíneo por vasodilatación lo que aumenta la oxigenación, favorece las reacciones químicas y la acumulación de las drogas en el tumor. Por lo que sensibiliza a la quimioterapia [338] y radioterapia [339], sin embargo por sí sola no es suficiente para matar células [335]. De acuerdo al forum internacional de 2004 de la fundación Kadota, se denomina hipertermia al aumento de temperatura suave entre 39 y 45°C, a partir de ahí se considera ablación térmica [340].

La nanotecnología ha permitido mejorar la terapia hipertérmica con el desarrollo de NPs que son capaces de generar calor al ser irradiadas. Este calor es capaz de matar a las células, lo que se denomina ablación térmica [341]. El uso de NPs presenta varias ventajas, como su biocompatibilidad y su baja toxicidad, ya que las NPs se pueden dirigir específicamente al tumor, por lo que se acumulan allí y no se daña el tejido sano. Además presentan mayor penetrancia, siendo capaces de aumentar en mayor grado, la temperatura en tumores localizados en cualquier zona del cuerpo.

Primeramente se propuso en 1957 el uso de materiales magnéticos para generar hipertermia [342]. Así se ha ido desarrollando la hipertermia magnética, basada en la generación de calor mediante NPs magnéticas expuestas a campos magnéticos alternos. Varios estudios han probado su eficacia como terapia por sí misma [343, 344], lo que no era posible con las técnicas convencionales. Sin embargo, su eficiencia es muy variable, depende de las propiedades de la NP como el tamaño y temperatura de Curie, que es la temperatura máxima que se puede utilizar evitando el sobrecalentamiento. Además de otros parámetros como la intensidad y frecuencia del campo magnético o la disipación del calor del tumor [345].

Dentro de las NPs, las AuNPs presentan un mayor potencial para aplicaciones biomédicas debido a su alta eficiencia en la absorción de luz por unidad de volumen, que transforman en calor. Además presentan una gran fotoestabilidad y absorben en el NIR por lo que presentan gran penetrancia

[346]. La terapia con este tipo de NPs se denomina hipertermia óptica también conocida como terapia fototérmica (PTT, "photothermal therapy") [347]. Numerosos estudios han demostrado su eficacia como terapia por sí sola [348] o en cooperación con radioterapia o quimioterapia [349]. Aunque también presentan limitaciones, como la monitorización y control de la temperatura del tumor.

En los últimos años también ha empezado a utilizarse nanotubos de carbono para PTT [15].

Algunos estudios se han centrado en el efecto de la hipertermia sobre distintos mecanismos celulares, particularmente en la respuesta al choque térmico, ciclo celular o apoptosis [350], influencia en la irrigación del tumor, suministro de nutrientes y oxígeno, o incluso en la respuesta inmune celular [351, 352]. Los mecanismos intracelulares relacionados con el choque térmico incluyen la desnaturalización y agregación de proteínas, alteración en la transducción de señales, inducción de apoptosis, cambios en el pH y disminución en la perfusión y oxigenación del tumor [332]. Además se ha observado una respuesta inmune antitumoral [352] después del tratamiento de hipertermia, debido a la expresión de proteínas de choque térmico (HSP, "Heat Shock Proteins") [344].

Las proteínas de choque térmico se diferencian según actúan como chaperonas o proteasas. Las Hsp se clasifican en 6 familias según su peso molecular Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y otras de pequeño peso molecular [353]. La regulación de las Hsp viene dada por factores de transcripción HSF, una de las señales para la expresión de Hsp es la presencia elevada de proteínas dañadas [354]. Las proteínas de choque térmico de la familia Hsp70 se expresan bajo situaciones de estrés, como en ambientes con gran cantidad de ROS, hipoxia, incremento de temperatura, altos niveles de proteínas desnaturalizadas, etc [355] y actúan como chaperonas [356] como mecanismo de protección de la célula.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Líneas celulares

En este trabajo se han empleado las líneas celulares que se describen a continuación.

a) Humanas:

- **A549**: Carcinoma de pulmón
- **HeLa**: Carcinoma de cervix
- **MiaPaca**: Carcinoma de páncreas
- **K562**: Leucemia mieloide crónica

b) Murinas:

- **MC57G**: Fibrosarcoma
- **L929**: Fibrosarcoma
- **B16**: Melanoma
- **EL4**: Linfoma T
- **MEFsv40**: Fibroblastos embrionarios de ratón de la estirpe C57BL6 H2Kb/Db (H-2b) transformados con el virus sv40. De estas células contamos con diferentes mutantes que se detallan a continuación. Estos mutantes proceden de los correspondientes ratones Knock out (KO).

Los **MEFsv40 wt** (de origen silvestre o del inglés wild type) y **MEFsv40 BakBax^{-/-}** (MEFsv40 que no expresan Bak ni Bax) fueron cedidos por el Dr. Christoph Borner (Institute of Molecular Medicine and Cell Research, Center for Biochemistry and Molecular Research, Freiburg, Germany)[357]. Los **MEFsv40 Bid^{-/-}** (MEFsv40 que no expresan Bid) fueron generados y cedidos amablemente por el laboratorio de SJ Korsmeyer. Mientras que los **MEFsv40 Casp3^{-/-}** y **MEFsv40 Casp9^{-/-}** (MEFsv40 que no expresan las caspasas 3 y 9 respectivamente) fueron cedidos por el grupo de Richard A Flavell [358]

- **MEF3T9**: Fibroblastos embrionarios de ratón obtenidos mediante la transformación 3T9 (ver 3.1.10) de las células primarias MEF correspondientes. Estas células primarias fueron obtenidas de diferentes ratones y cedidas por el Dr Thomas Reinheckel (Institute of Molecular

Medicine and Cell Research, Center for Biochemistry and Molecular Research, Freiburg, Germany)

MEF3T9 catBwt obtenidos de ratones FVB/N. **MEF3T9 catB^{-/-}** obtenidos de ratones FVB/N que no expresan catepsina B. **MEF3T9 catDwt** obtenidos de ratones C57BL6. **MEF3T9 catD^{-/-}** obtenidos de ratones C57BL6 que no expresan catepsina D.

Las líneas celulares K562 y EL4 fueron cultivadas con medio RPMI1640 (Sigma) suplementado con 5% SFB (Sigma, Lonza). El resto de líneas celulares, a excepción de MC57G que se cultivó con MEM (Sigma), fueron cultivadas con DMEM (Sigma, Panreac, Lonza...), ambos suplementados con 10% SFB (Sigma, Lonza). En todos los casos el medio se suplementó además con antibiótico 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Gibco, Sigma), y 2 mM GlutaMAX (Sigma) En el caso de las células A549 el medio contenía también 2,2 g/L NaHCO₃, 100 mg/L de piruvato y 5 mL (en 500 mL de medio) de aminoácidos no esenciales.

3.1.2 Mantenimiento de los cultivos celulares

El mantenimiento de las líneas celulares se ha llevado a cabo a 37°C en aire saturado en humedad y con un 5% CO₂ en frascos de cultivo de 25 cm² (5 mL) o 75 cm² (15 mL) con tapón de filtro (TPP o Corning).

El mantenimiento de las líneas adherentes se realizó cada 3-4 días (cuando alcanzan la densidad de saturación), para ello se retiró el medio de cultivo, se despegaron con 0.25% tripsina/EDTA (Sigma) durante 5 min a 37°C, se neutralizó la tripsina con medio con suero y tras resuspender las células se diluyeron en medio fresco una densidad aproximada de 5·10⁴ cél/mL, sembrando 5mL en frasco de cultivo pequeño (25 cm²).

El mantenimiento de las líneas en suspensión se realizó también cada 3-4 días y consistió en diluirlas en medio fresco a una densidad de 2·10⁵ cél/mL.

Todas las manipulaciones se han realizado en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar.

3.1.3 Contaje y determinación de la viabilidad celular

La viabilidad se determinó mediante la tinción con azul de Tripán, que se basa en la distinción de las células según la integridad de su membrana. Las células muertas que han perdido la integridad de la membrana son permeables a este colorante y se observan azules, mientras que las células vivas o las que

mantiene intacta su membrana son impermeables y no incorporan el colorante. Las células apoptóticas que mantienen intacta su membrana no incorporan el colorante por lo que no son tenidas en cuenta. El procedimiento se llevó a cabo mezclando 20-50 μL de la suspensión celular con el mismo volumen de una solución de 0.4% azul de Tripán en 0.15 M NaCl (Panreac). La mezcla se depositó sobre un hemocitómetro o cámara de Neubauer y se procedió a su conteo con un microscopio óptico. La viabilidad celular se determinó con el porcentaje de células viables (no coloreadas) respecto del total.

3.1.4 Congelación y descongelación de líneas celulares

Las células cultivadas hasta su densidad de saturación se contaron con una cámara de Neubauer, se centrifugaron 5 min a 300 xg y tras eliminar el sobrenadante se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente con un 10% DMSO, dimetilsulfóxido (Sigma) a una densidad aproximada de $5 \cdot 10^6$ cél/mL. Inmediatamente se guardaron los viales de congelación (Nunc o Corning) en un congelador a -80°C durante al menos 48 h. Tras este tiempo, los viales pudieron ser traspasados a un contenedor de nitrógeno líquido hasta el momento de volver a utilizarlas.

Para descongelar las células se preparó un tubo de centrifuga con unos 10 mL de medio del que se fue añadiendo gradualmente al mismo vial de congelación, de forma que la descongelación fuera progresiva y el DMSO se diluyera rápidamente para evitar que se dañen las células debido a su toxicidad. A continuación se centrifugaron 5 min a 200 xg, se desechó el sobrenadante, se resuspendieron y contaron para determinar su viabilidad y se sembraron las células a una densidad entre el doble de lo habitual y la mitad de la densidad de saturación. Una vez las células se recuperaron del proceso de congelación y descongelación (1 o 2 pases) se sembraron a la densidad habitual.

3.1.5 Inactivación del complemento del suero

En los experimentos realizados con células primarias, el suero utilizado se deplementó para evitar la lisis de las células por el sistema del complemento. Para ello, el suero se calentó durante 30 min a 56°C (baño) y trascurrido este tiempo se centrifugó 15 min a 2000 xg. El sobrenadante se recogió en un tubo de fondo cónico y se congeló hasta su uso o se utilizó directamente para preparar el medio correspondiente.

3.1.6 Determinación de la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares

La detección de micoplasmas se realizó de modo rutinario en todas las células en cultivo al menos cada 2 meses. Para una detección óptima de los micoplasmas las células deben haber permanecido al menos 48h en cultivo para proceder al análisis. Como muestra se tomó el sobrenadante del cultivo de cada línea centrifugado. La detección se pudo llevar a cabo de forma inmediata o en el caso contrario se congelaron los sobrenadantes a -20°C hasta el momento del análisis. La detección de micoplasmas se llevó a cabo mediante dos técnicas:

3.1.6.1 PCR

Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores de la reacción fueron:

Mico A: 5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'

Mico B: 5-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'

La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía por cada muestra:

5 μL de tampón de reacción (MgCl_2 15 mM, KCl 500 mM, 1 % Tritónx100, Tris -HCl 100 mM pH 8.8)

2.5 μL de cebador Mico A 10 μM

0.25 μL de cebador Mico B 100 μM

5 μL dNTPs 2 mM

2 μL de sobrenadante

0.5 μL de Taq polimerasa 2 U/ μL

36.5 μL de agua Milli-Q estéril

Como control negativo de la amplificación se preparó la misma mezcla anterior sustituyendo el sobrenadante celular por H_2O libre de DNAsas y como control positivo se utilizó el sobrenadante de un cultivo celular contaminado, testado con anterioridad.

La amplificación se realizó con el siguiente programa de PCR:

1. Calentamiento inicial: 94 °C / 3 min
2. Desnaturalización: 94 °C / 30 seg.
3. Hibridación: 60 °C / 30 seg.
4. Extensión: 72 °C / 30 seg.
5. Extensión: 72 °C / 5 min

30 ciclos: pasos 2-4.

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 1% en TBE (0.045 M Tris-borato, 1 mM EDTA) que contenía SYBR® Safe DNA gel stain 1x (Invitrogen). Como marcadores de peso molecular se utilizó el 100 bp DNA ladder de Promega. La visualización se llevó cabo en el transiluminador Gel Doc 2000 de BioRad Laboratories (Hércules, CA) y se analizó mediante el programa Bio-Rad Muti-Analyst (PC versión 1.1). En caso de resultado positivo apareció una banda de aproximadamente 500 bp.

3.1.6.2 Luminiscencia

Además en el servicio de cultivos celulares del CIBA se procedió al análisis de micoplasmas mediante una reacción bioquímica luminiscente. Este ensayo detecta la actividad de enzimas presentes en los micoplasmas utilizando un sustrato que genera ATP, el ATP es detectado gracias a la enzima luciferasa que lo transforma en una señal luminiscente.

3.1.7 Eliminación de micoplasmas

En el caso de salir positivo el test de micoplasmas se procedió de dos maneras; si se disponía de nuevas células sin micoplasmas se desecharon las contaminadas y se descongelaron nuevamente. En el caso contrario se procedió a su desinfección con un tratamiento durante 3 semanas que consistió en alternar el tratamiento con ciclina 1 (10 µg/mL) durante 3 días y posteriormente con ciclina 2 (5 µg/mL) durante 4 días (ambas de Roche). Este ciclo se repitió 3 veces.

Tras el tratamiento se procedió a la determinación de micoplasmas nuevamente para confirmar la desinfección.

3.1.8 Inmortalización de células primarias 3T9

Esta inmortalización se produce de modo espontáneo y se basa en que algunas células del cultivo, de forma espontánea pierden la expresión de p53 y/o ARF [359].

A partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) wild type (wt) o carentes de las catepsinas B o D en su 2º o 3º pase, se procedió a su inmortalización mediante la técnica 3T9. Esta técnica consiste en cada 3 días, tripsinizar las células y sembrarlas a una densidad de $9 \cdot 10^5$ células en 3.5 mL en placas petri de 6 cm de diámetro (TPP). Entre los pases 10 y 20 se empieza a observar el cambio, las células pierden su morfología de fibroblastos y crecen más deprisa. Una vez en este punto se procedió a la congelación de los cultivos.

Con esta mezcla de células inmortalizadas (pool) se procedió a llevar a cabo los experimentos correspondientes.

3.1.9 Obtención de medio condicionado

El medio condicionado es medio que ha estado en contacto con un cultivo celular, de forma que presenta factores de crecimiento y diferenciación segregados por dicho cultivo. Este medio se obtiene tras unos días en contacto con el cultivo y su posterior filtrado (filtros 0.22 μm , Fischer) para eliminar restos y células.

Para llevar a cabo una dilución límite bastan 1 o 2 días para conseguir el medio condicionado, sin embargo para obtener el medio condicionado de las células L929 con los factores de diferenciación de macrófagos (ver 3.2) se necesitaron 7 días. Este medio se congeló a -20°C hasta su uso.

3.2 Obtención de macrófagos a partir de médula ósea de ratón

A partir de fémures, tibias y cúbitos de ratones C57BL10 de entre 6 y 12 semanas de edad se procedió a la obtención de células de la médula ósea. Para ello se desinfectaron los huesos con etanol, tras lavarlos con medio DMEM para eliminar el exceso de etanol, se procedió a eliminar el tejido muscular en una placa petri (TPP) de 10 cm de diámetro. Tras la "limpieza" del hueso, se lavaron otra vez con etanol y con medio y se procedió a la extracción en condiciones estériles sobre otra placa petri con medio, cortando los huesos por los extremos e inyectando medio en la cavidad de la médula ósea varias veces. Se resuspendió bien hasta conseguir una suspensión homogénea que se pasó por un filtro de nylon de 100 μm (BD) sobre un tubo de centrifuga de

50 mL (TPP o Corning). Se centrifugó a 300 xg durante 5 min y se resuspendió el pellet en 10 mL de medio BMDM (medio DMEM suplementado con 10% SFB (Sigma) y 5% suero de caballo (HS) (Sigma) (para la inhibición del crecimiento de fibroblastos) ambos de complementados, 2 mM GlutaMAX (Sigma) y 10% medio condicionado de células L929 (ver 3.1.9) como fuente de M-CSF (del inglés "granulocyte/macrophage colony stimulating factor")). Se tomó una alícuota para contar las células y ajustar la densidad a 10^6 cél/mL, tras lo cual se sembraron 15 mL en placas petri. Al tercer o cuarto día se cambió el medio. Al sexto día se tripsinizaron las células previo lavado con PBS, siendo necesario el uso de rasqueta para despegarlas. Se inactivó la tripsina con medio con suero, se centrifugó 5 min a 300 xg y se resuspendieron las células en 10 mL de medio BMDM para su conteo y posterior ajuste a la densidad deseada para el correspondiente experimento.

Estos ratones se han mantenido y criado en condiciones libres de patógenos en el animalario del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón con ciclos de 12h de luz. Todos los experimentos llevados a cabo con ratones se realizaron de acuerdo al RD53/2013 el cual reúne la Directiva de la Unión Europea 2010/63 en relación a la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales.

3.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Estas células se extrajeron de la capa leuco-plaquetaria de sangre de donantes sanos. La sangre fue proporcionada por el banco de sangre y tejidos de Aragón.

Se diluyeron 5 mL de la sangre con 40 mL de PBS y se procedió a separar las células mononucleares en gradiente de densidad. Para ello se prepararon tubos de centrifuga con 15 mL de Ficoll-Paque (GE, Healthcare) sobre los cuales se fue añadiendo despacio la sangre diluida de forma que resbalara por las paredes evitando así que se mezclara con el ficoll. Se centrifugó a 400 xg durante 30 min (sin frenos) obteniéndose un anillo blanco en la interfase entre el ficoll y el medio acuoso en el que se encuentran las células mononucleares. Se recogió esta fracción y tras un lavado con PBS para eliminar las plaquetas se resuspendió en RPMI1640 (Sigma) suplementado con 10% SFB (Sigma, Lonza) de complementado, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina (Gibco), y 2 mM GlutaMAX (Sigma).

3.4 Síntesis y funcionalización de nanoprismas de Oro

3.4.1 Síntesis

Se mezclaron 100 mL de una disolución 2 mM de HAuCl_4 y 120 mL de 0.5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ recién preparado (ambos de Sigma-Aldrich) y se incubaron en agitación suave durante 9 min, posteriormente se procedió a una segunda adición de 0.5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 50 mL [31].

3.4.2 Funcionalización

Para aumentar su estabilidad, los nanoprismas (NPRs) se incubaron durante toda la noche con 0,5x de SH-PEG-COOH (Rapp-Polymere), a un pH de 12 (ajustando el pH con NaOH) en agitación suave. Se centrifugaron dos veces a 10000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en agua Milli-Q. Los NPRs fueron cargados en un gel de agarosa 0,6x inmerso en tampón TBE a 100 V durante 1 h separándose dos bandas debido al incremento en la movilidad de otras nanopartículas. La banda correspondiente a los NPRs se cortó y se introdujo en membranas de diálisis (10 KDa) inmersas en una cubeta de electroforesis y se aplicó 100 V durante 2 h para su extracción.

Se incubaron los NPRs recubiertos con PEG con EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) y Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) en MES pH 6 (todo de Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 25 min. Previa activación de EDC y sulfo-NHS durante 10 min en hielo. Las cantidades de cada reactivo fueron por cada mg de NPRs x2 EDC y x4 Sulfo-NHS. Tras un lavado por una columna PD-10 sephadex G-25M (GE Healthcare) para eliminar el exceso de EDC y sulfo-NHS tal y como indica el fabricante, se añadió 0,5 mg de glucosa (Sigma-Aldrich) y/o TAMRA (5-TAMRA cadaverina) (Anaspec) y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm durante 6 min y se resuspendió en el volumen necesario. [31]

Así se obtuvieron 5 tipos de NPRs;

NPRs: Nanoprismas recubiertos con PEG

NPR-G: Nanoprismas recubiertos con PEG, con glucosa

NPR-T: Nanoprismas recubiertos con PEG, con el fluoróforo TAMRA

NPR-TG: Nanoprismas recubiertos con PEG, con TAMRA y glucosa

NPR-AG: Nanoprismas recubiertos con PEG, con el fluoróforo Alexa-647 y glucosa

3.5 Citotoxicidad y entrada en la célula de AuNPRs

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido el estudio de la toxicidad de nanoprismas de oro. Para ello se utilizaron tanto líneas celulares (ver 3.1, líneas wt) como células primarias de ratón (macrófagos, ver 3.2) o humanas (PBMCs, ver 3.3) y se incubaron con distintas cantidades de los nanoprismas (0, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$).

Células	Tiempo (h)	Placa (pocillos)	Volumen (μL)	Densidad (cél/mL)	Análisis
Líneas	2	96	100	$2 \cdot 10^5$	ROS
Macrófagos	2	96	100	$2 \cdot 10^5$	ROS
PMBCs	2	96	100	$2 \cdot 10^5$	ROS
Líneas	48	48	200	$2 \cdot 10^5$	ROS, apoptosis, clonogénico
Macrófagos	48	48	200	$2.5 \cdot 10^5$	ROS, apoptosis
PMBCs	48	48	200	$6.3 \cdot 10^5$	ROS, apoptosis
Líneas	24	24	400	$2.5 \cdot 10^5$	Microscopía confocal
Macrófagos	24	24	400	$2.5 \cdot 10^5$	Microscopía confocal
PMBCs	24	48	200	$6.3 \cdot 10^5$	Microscopía confocal

Tabla 3.1: Especificaciones experimentos. En la tabla se detallan el número de células, tipo de placa y volumen utilizado para cada experimento según el tiempo de duración de este y el análisis que se vaya a realizar posterior al tratamiento.

Las células se contaron y se sembraron en placas a las densidades y volúmenes que se especifican en la tabla 3.1 según el objetivo del experimento. En el caso de líneas celulares adherentes se incubaron unas 5-6 h a 37°C para que se adhirieran a la placa y en el caso de macrófagos se incubaron 24 h. El tiempo de incubación con los nanoprismas dependió del objetivo del

experimento y viene detallado en la tabla 3.1. Tras ese tiempo se procedió a realizar los diversos análisis; generación de ROS (ver 3.11.3), distintos parámetros apoptóticos como exposición de fosfatidilserina (ver 3.11.1), caída de potencial mitocondrial (ver 3.11.2), ensayo clonogénico (ver 3.12) o microscopía de fluorescencia confocal (ver 3.15)

A la vez se utilizaron distintos controles de muerte celular; para las líneas celulares y macrófagos se incubaron con 1 μM de estaurosporina y para los PMBCs con 5 μM cladribina.

3.6 Activación de NKs

En el apartado 3.3 se obtienen de la fracción leuco-plaquetaria de sangre de donantes sanos, un conjunto de células mononucleares (PBMCs) entre las que se encuentran las células asesinas naturales (NKs). Estas células para que actúen sobre células diana de modo eficiente, es necesario que se activen. La activación se puede llevar a cabo de muchas maneras [360], pero para nuestro estudio en el que queremos saber el efecto que tienen los nanoprismas sobre la activación de las NKs, activamos con IL2 (Peprotech) ya que es la forma de introducir las mínimas variables posibles.

Para ello se siembran los PBMCs a una densidad de 10^6 cél/mL con 100 UI/mL de IL-2 y distintas concentraciones de NPR-G (0, 25, 50, 100, y 200 $\mu\text{g/mL}$) y se incuban a 37°C durante 6 días.

El medio en el que se lleva a cabo la activación es RPMI1640 suplementado con 10% SFB (Sigma, Lonza) de complementado, 100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomina y 2 mM GlutaMAX.

3.7 Separación de poblaciones celulares mediante MACS (separación celular basada en campos magnéticos).

En el apartado anterior se obtiene una población de células mixta de la cual nos puede interesar estudiar una población concreta. Para ello se separan las células de interés mediante anticuerpos específicos unidos a microesferas metálicas y posterior selección en columnas que se colocan en el interior de un campo magnético. La selección puede ser positiva (nos quedamos con las células que se unen al anticuerpo y por lo tanto quedan retenidas en la columna) o negativa, cuando nos interesa eliminar un tipo celular (nos quedamos con las células que no se retienen en la columna).

En nuestro caso quisimos obtener células NK, para ello se incubó el pellet de células mononucleares en tampón MACS (PBS con 0,5% SFB y 2 mM EDTA) a una densidad de 10^7 células en 80 μ L, al que se añadió 20 μ L del anticuerpo anti-CD56 (clon AF12-7H3). Se incubó 10 min a 4°C y se lavó con tampón MACS centrifugando durante 5 min a 300 xg. Tras lo cual se procedió a la separación en columnas LS según las instrucciones del fabricante. Tanto las columnas como el anticuerpo utilizados provienen de Miltenyi Biotec.

3.8 Marcaje de las células con sondas fluorescentes

Para evaluar la citotoxicidad de células efectoras (CTLs, NKs) sobre células diana, analizamos parámetros de apoptosis en las células diana mediante citometría de flujo. Al tener presentes varios tipos celulares necesitamos separar, durante el análisis, la población de células diana de las efectoras. Para ello marcamos las células diana o las efectoras con una sonda fluorescente que emite en una longitud de onda correspondiente al color verde (Cell Tracker Green, CTG, $\lambda_{abs}=492\text{nm}$, $\lambda_{em}=517\text{nm}$) obtenida de Invitrogen que se utiliza a 1 μ M, o al color rojo (eFluor670, $\lambda_{abs}=647\text{nm}$, $\lambda_{em}=670\text{nm}$), proveniente de eBioscience a 1 μ M.

Para el marcaje con la sonda eFluor670 las células se incuban 5 min con la sonda en PBS 5% SFB a 37°C y 10 min a 4°C. Posteriormente se centrifuga a 300 xg durante 5 min y se incuban a 37°C con el mismo medio durante 30 min. Tras lo cual se lavan dos veces más, se cuentan y se ponen a la densidad adecuada para el experimento. Para el marcaje con la sonda CTG la única diferencia es que la incubación con ésta se lleva a cabo a 37°C los 15 min.

3.9 Citotoxicidad mediada por células NK

Los estudios de citotoxicidad de células citotóxicas (CTLs o NKs) se llevan a cabo analizando la muerte de células diana cuando se enfrentan a estas células citotóxicas (o efectoras).

Para el estudio de citotoxicidad mediada por células NK (efectoras) se utilizaron como células diana la línea celular K562, que carece de MHC-I y es por lo tanto una diana para las células NK. Para ello se activaron las células NK con IL-2 (ver 3.6) pudiendo separarse mediante MACS o no (ver 3.7) y se marcaron las células diana con una sonda fluorescente (ver 3.8). Se incubaron las células diana marcadas a una densidad de $4\text{-}5\cdot 10^5$ cél/mL en 100 μ L en placas de 96 pocillos de fondo cónico con otros 100 μ L de las células efectoras a distintas relaciones efector:diana y se incubaron a 37°C durante 4 h.

3.10 Análisis de proteínas

3.10.1 Análisis de proteínas por Western-Blot

El análisis de proteínas por Western-Blot o inmunoblot consiste en lisar las células para obtener una mezcla de proteínas que se separan según su tamaño en gel desnaturizante de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, identificando cada una de ellas con un anticuerpo específico. Este procedimiento conlleva varios pasos que se describen a continuación.

Los distintos reactivos utilizados en todo el proceso se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

La acrilamida y la N,N'-metilen-bisacrilamida, así como las cubetas de electroforesis y los aparatos de transferencia fueron de Biorad. El persulfato sódico, la aprotinina, leupeptina, EDTA, Tritón X-100, ortovanadato sódico, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), pirofosfato sódico, Tween-20, azul de bromofenol, N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (T.E.M.E.D.), bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y el nitroazul de tetrazolio (NBT) fueron productos de Sigma. Los inhibidores de proteasas de Roche. De Merck se obtuvo el dodecilsulfatosódico (SDS) y el glicerol de Scharlau. Las membranas de PVDF fueron de GE Healthcare. Los patrones de pesos moleculares coloreados utilizados en las electroforesis de proteínas fueron de Thermo. Las cubetas de electroforesis y los aparatos de transferencia fueron de BioRad.

3.10.1.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares con detergentes.

Se centrifugaron las células procedentes de un cultivo o un experimento (previo conteo) durante 5 min a 300 xg, se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron 1 vez con PBS. Tras dejar el pellet 1 o 2 min en hielo, se resuspendió en un tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM pH 7.6, glicerol 10% (v/v), EDTA 1mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, leupeptina 10 µg/mL, NaF 10 mM, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas) de forma que quedara una concentración entre 10^7 - $5 \cdot 10^7$ cél/mL y se incubaron en hielo durante 30 min [361]. Los tubos se centrifugaron durante 15 min, 4°C, 10.000 xg y los sobrenadantes se trasvasaron a tubos Eppendorf, constituyendo la fracción soluble en Tritón X-100. Estos sobrenadantes (extracto de proteínas) se congelaron a -20°C hasta su uso.

3.10.1.2 Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

A los sobrenadantes obtenidos en el apartado anterior se les añadieron 1/3 de tampón de carga, una disolución 3x preparada en agua Milli Q que contenía TrisHCl 150 mM pH 7.4, SDS 3%, molibdato de sodio 0.3 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, NaF 30 mM, glicerol 30% (v/v), mercaptoetanol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,06% (v/v). Posteriormente se hirvió durante 5 min en un termobloque, se centrifugaron a 10000 xg 30 seg y se cargaron (10-20 µL) en el gel de poliacrilamida, que contenía 0.1% de SDS y un porcentaje de poliacrilamida variable entre 12-15% dependiendo del tamaño de la proteína a estudio.

Las electroforesis se realizaron a un amperaje constante de 20 mA/gel y un voltaje de 180 V durante 60-90 min. La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de electroforesis con una composición Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 3.4 mM.

3.10.1.3 Transferencia de proteínas a membranas.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (pre-incubadas 30 seg con metanol) mediante un equipo de transferencia semiseca de BioRad. En la transferencia se utilizó un tampón de transferencia compuesto por TrisHCl pH 8.3 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol de calidad HPLC 20% (v/v). La transferencia se realizó a 20 V y 400 mA durante 55 min.

3.10.1.4 Análisis de proteínas por inmunoblot (Western blotting).

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con anticuerpos específicos. Previamente, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo (Asturiana) al 5% (p/v) disuelta en un tampón B (PBS pH 7.4 con NaCl 0.12 M, Tris/HCl 10 mM y Tween-20 0.5% (p/v)) durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche, a 4°C y con agitación suave, con el anticuerpo específico para detectar la proteína deseada (primario) a la concentración indicada en la tabla 3.2 en una solución de leche en polvo al 2.5% (p/v) en tampón B (tampón A). Finalizada la incubación la membrana se lavó con tampón B, 4 veces durante 5 min, en agitación suave. Seguidamente, las membranas se incubaron en tampón A con el anticuerpo secundario correspondiente, según la especie de origen del anticuerpo primario, conjugado con fosfatasa alcalina (PA) o peroxidasa (PO), durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave. En todos los casos se utilizó una concentración de anticuerpo de 0.2 µg/mL, para la fosfatasa alcalina, y 0.05 µg/mL para la

peroxidasa. La solución del anticuerpo se retiró y la membrana se lavó 3 veces durante 5 min, agitando moderadamente con tampón B.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Especie
Bid		BD	1/1000	Cabra
Hsp70	C92F3A-5	Stressgen	1/1000	Ratón
Caspasa-3		Cell Signaling	1/1000	Conejo
Caspasa-3 activa		Cell Signaling	1/1000	Conejo
β-Actina		Sigma	1/1000	Ratón
α-Tubulina		Sigma	1/1000	Ratón
IgG-PA de ratón		Sigma	1/20000	
IgG-PO de ratón		Sigma	1/20000	
IgG-PO de cabra		Sigma	1/5000	
IgG-PO de conejo		Sigma	1/20000	

Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para inmunoblot. Para revelar los inmunoblots se incubaron las membranas con anticuerpos primarios que reconocen la proteína a estudio, seguidos de anticuerpos secundarios unidos a la fosfatasa alcalina (PA) o peroxidasa (PO). Los anticuerpos monoclonales viene especificado el clon.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante captación de la señal quimioluminiscente en films fotográficos. Los sustratos para la fosfatasa alcalina y para la peroxidasa fueron obtenidos de Novagen y Thermo respectivamente. En ambos casos se añade el sustrato directamente sobre la membrana y se deja incubar 5 min en el primer caso y 1 o 2 min en el segundo, tiempo tras el cual se elimina el sustrato y se pone la membrana en el cassette de revelado. Los intervalos de tiempo de exposición del film a la membrana variaron en función del anticuerpo, desde unos segundos hasta varios minutos, aunque no es conveniente utilizar un tiempo de revelado muy largo debido al aumento de coloración inespecífica. Las membranas, una vez reveladas se escanearon y se conservaron a 4°C durante varios meses. Los líquidos de revelado y fijado utilizados fueron de la marca Kodak, y la preparación de los mismos se realizó según las instrucciones del fabricante.

Para el análisis cuantitativo de las bandas se usó el programa ImageJ. De este modo, las membranas se escanearon y se analizó, en función de la intensidad de la densidad óptica de cada banda por unidad de superficie, el nivel de expresión de la proteína de interés y de una proteína de referencia β -actina o α -tubulina.

3.10.2 Análisis de proteínas mediante tinción con Azul de Coomasie

La expresión de proteínas puede analizarse también tiñendo directamente el gel de electroforesis (ver 3.10.1.2) con Azul de Coomasie. Para ello se incubó el gel con la solución colorante que contiene 0.5 g Coomasie Brilliant Blue G, 450 mL de metanol, 60 mL de ácido acético y 490 mL de agua destilada. El tiempo de incubación puede variar entre 1 y 4 h, siendo menor cuanto más caliente esté la solución. Una vez se observó que el gel estaba azul y se apreciaban bandas se procedió a su decoloración durante varias horas con una solución decolorante que contiene 20 mL de glicerol, 100 mL de ácido acético, 250 mL de etanol y 630 mL de agua destilada. Este paso permite la decoloración del gel a excepción de las bandas correspondientes a las proteínas. El gel después de su escaneo se preservó con una solución preservadora que contiene 700 mL de metanol, 30 mL de glicerol y 270 mL de agua destilada.

Todos los pasos se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente.

3.10.3 Análisis de proteínas por citometría de flujo.

La citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos nos confiere la ventaja de poder analizar las proteínas en células únicas, en su forma nativa y en su localización original, ya que con esta técnica no necesitamos lisar las células.

El análisis por citometría de flujo necesita simplemente de un marcaje, que no es otra cosa que los distintos pasos de incubación de las células con los anticuerpos o reactivos necesarios. Para ello el marcaje se realiza en una solución tamponada que mimetiza las condiciones fisiológicas de la célula, en nuestro caso se utilizó PBS. A este PBS se puede añadir SFB para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, azida (sigma) que estabiliza la membrana celular o saponina que permeabiliza la célula. Estas dos últimas son necesarias en el caso de marcajes intracelulares. Una vez realizada esta aclaración vamos a explicar los procedimientos de marcaje de proteínas de superficie e intracelulares.

3.10.3.1 Análisis de proteínas de superficie

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Isotipo
CD3-FITC	145-2C11	Miltenyi	1/100	Ratón IgG1
CD3-PercP	145-2C11	Miltenyi	1/100	Ratón IgG1
CD56-PE	AF12-7H3	Miltenyi	1/100	Ratón IgG1
CD56-APC	AF12-7H3	Miltenyi	1/100	Ratón IgG1
CD16-FITC	VEP13	Miltenyi	1/100	Ratón IgG1
NKp30-PE	Z25	Beckman Coulter	1/50	Ratón IgG1
NKp44-PE	Z231	Beckman Coulter	1/50	Ratón IgG1
NKp46-PE	BAB281	Beckman Coulter	1/50	Ratón IgG1
DNAM1-PE	DX11	BD	1/50	Ratón IgG1
LFA-1-FITC	G43-25B	BD	1/100	Ratón IgG2a
IL2R		Bender MedSystems	1/100	Ratón IgG
IgG-Alexa488 de ratón		Invitrogen	1/1000	

Tabla 3.3. Anticuerpos de membrana para el análisis de proteínas se superficie por citometría de flujo y la dilución a la que se utilizaron. La primera parte del nombre corresponde a la proteína que reconocen seguido por un guión del fluoróforo unido a éste.

Isotipo	Clon	Casa comercial	Dilución
IgG1-FITC de ratón	MOPC-31C	Invitrogen	1/100
IgG2a-PE de Ratón	G155-178	BD	1/100
IgG1-PE de Ratón	P3.6.2.8.1	eBioscience	1/100

Tabla 3.4. Isotipos. (IgGs) utilizados como control de inespecificidad y las diluciones a las que se utilizaron.

Para el marcaje de proteínas de superficie se procedió a centrifugar las células (10^5 cél) durante 45 seg a 3000 xg. Tras un lavado con PBS. Se incubó el anticuerpo o el isotipo (control de inespecificidad) a la concentración adecuada en un volumen total de 100 μ L en PBS con 5% SFB durante 30 min a 4°C. Las cantidades de cada anticuerpo o el isotipo vienen recogidas en la tabla 3.3 y 3.4. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron 2 veces con PBS 5% SFB.

Si el anticuerpo está unido a un fluoróforo aquí acaba el marcaje. En el caso de anticuerpos que no lleven unido ningún fluoróforo es necesario una segunda incubación con un anticuerpo secundario dirigido frente al anticuerpo primario en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente para el anticuerpo primario.

Una vez estuvieron las células marcadas se pudieron analizar inmediatamente por citometría de flujo o se fijaron en 150 μ L de paraformaldehído al 1% (PFA 1%) durante 15 minutos a 4°C y se analizaron en las siguientes 24 h.

3.10.3.2 Análisis de proteínas intracelulares

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Isotipo
GzmB-PE	GB11	invitrogen	1/100	Ratón IgG1
Caspasa-3-FITC	C92-605	BD	10 μ L	
Isotipo IgG1 de ratón		invitrogen	1/100	

Tabla 3.5. Anticuerpos intracelulares. Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas intracelulares mediante citometría de flujo y la dilución a la que se utilizaron. Los dos primeros corresponden a los anticuerpos y el último al isotipos utilizado como control de inespecificidad.

En el caso de proteínas intracelulares es necesario permeabilizar la célula para permitir la entrada del anticuerpo. Para ello se procedió a centrifugar las células (10^5 cél) 45 seg a 3000 xg, y se fijaron con PFA 1% durante 15 min a 4°C. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS 5% SFB y 5% azida y seguidamente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con PBS 5% SFB y 0.1% saponina para permeabilizar la membrana. Tras este tiempo se procedió a la incubación del anticuerpo correspondiente (tabla 3.5) en 100 μ L de PBS 5% SFB 0.1% saponina durante 45 minutos a 4°C. Con la particularidad de la caspasa-3 para la que se incubaron 10 μ L del anticuerpo en la gota que quedó. Después de la incubación se lavó dos veces con PBS 5%

SFB 5% azida para eliminar el anticuerpo sin unir y se resuspendió en PBS para analizar por citometría inmediatamente o se fijó en PFA, como se ha explicado en el apartado anterior.

3.11 Análisis de la muerte celular por citometría de flujo

Todos los marcajes con fluoróforos o sondas fluorescentes se realizaron evitando al máximo la exposición a la luz y la incubación con éstos se llevó a cabo en oscuridad.

3.11.1 Análisis de traslocación de fosfatidilserina y la permeabilización de la membrana celular

Como se explicó en la introducción una de las características de la apoptosis es la traslocación de la fosfatidilserina (PS) de la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa. Este cambio se puede detectar por citometría de flujo realizando un marcaje extracelular con anexina-V (AnnV) que se unirá a la fosfatidilserina si ésta está accesible (cara externa). La AnnV puede estar unida a varios fluoróforos como FITC o APC.

Para distinguir las células necróticas se utilizó una sonda que penetra en la célula cuando ésta pierde la integridad de la membrana, 7-Aminoactinomycin D (7-AAD).

Las células necróticas al perder la integridad de la membrana pueden marcar también AnV. Por lo que determinamos como fenotipo necrótico las células que marcan tanto anexina como 7AAD (AnnV+/7AAD+) y las células apoptóticas aquellas que solo marcan AnnV (AnnV+/7AAD-).

El procedimiento de marcaje consistió en centrifugar las células (10^5) y lavarlas con PBS. Seguidamente se resuspendieron en 100 μ L de ABB (tampón de unión de la AnnV, Immunostep) que contienen 1 o 1.5 μ L de AnnV dependiendo de si está unida a APC o a FITC respectivamente y 1.5 μ L de 7AAD y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación se procedió a su análisis por citometría de flujo de forma inmediata o se fijó en 150 μ L PFA 1% con calcio (diluido en ABB o PBS con calcio, Immunostep o PAN) (necesario para que la AnnV se mantenga unida a la PS) durante 20 min a 4°C y se analizaron en las siguientes 24 h.

3.11.2 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se debe a la cadena de transporte de electrones y a la ATPasa que genera un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). Este potencial alto y constante en condiciones normales, disminuye en las primeras etapas de apoptosis [362]. Para determinar el potencial mitocondrial se utilizó la sonda DIOC₆ (Invitrogen) que se une a la membrana interna mitocondrial cuando se encuentra cargada negativamente, cuando el gradiente disminuye la sonda se va perdiendo y esta diferencia se puede analizar por citometría de flujo. Para ello se centrifugaron las células (10⁵) y se incubaron con 20 nM de DIOC₆ en 100 µL de medio o ABB (si se marca junto con AnnV y 7AAD) a 37°C durante 15 min y se analizaron por citometría de flujo inmediatamente, ya que no es posible fijar este marcaje.

3.11.3 Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación del anión superóxido puede ser producido tanto por la mitocondria como por NADPH oxidasas y su determinación se llevó a cabo mediante la molécula 2-hidroxi-etidio (2HE) (Invitrogen). Esta molécula se oxida a etidio en presencia del anión superóxido de forma que emite fluorescencia amarillo/naranja ($\lambda_{abs}=518\text{nm}$, $\lambda_{em}=606\text{nm}$).

Las células (10⁵) se centrifugaron y se incubaron con 2 µM de 2HE en 100 µL de medio durante 15 min a 37°C.

3.11.4 Análisis de la activación de la caspasa 3

Para analizar la activación de la caspasa 3 se utilizó un anticuerpo dirigido contra la forma activa de la caspasa 3 conjugado a FITC (BD) [363]. Para ello se centrifugaron las células, se procedió a realizar un marcaje intracelular (ver marcaje de proteínas intracelulares 3.10.3.2) con la peculiaridad de que no se incubó el anticuerpo en 100 µL si no que se añadió directamente el anticuerpo (10 µL) a la gota que queda tras la centrifugación después de incubar con PBS 0,1% saponina 5% SFB durante 10 min. La incubación tuvo lugar a temperatura ambiente.

3.12 Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico analiza la capacidad que tienen las células de formar colonias, para ello no sólo es necesario que la célula esté viva, sino que además tenga la capacidad de dividirse.

El ensayo consistió en sembrar 100 células después de distintos tratamientos (ver 3.5) en 3 mL del medio correspondiente en placas de 6 pocillos. Transcurridas 2 semanas se eliminó el sobrenadante y se procedió a contar las colonias tras fijarlas y teñirlas con una disolución de glutaraldehído (6% v/v) que contiene cristal de violeta (0,5% p/v) a temperatura ambiente durante unos 15 min. Los resultados se representan como el porcentaje de colonias formadas respecto al control (células sin tratar).

3.13 Test de proliferación celular de Mossman (MTT)

Se utilizó una modificación del método de Mossman (Alley et al., 1988) para determinar la proliferación celular tras los distintos tratamientos con drogas, NPs, etc. Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazán, insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT, Sigma). La cantidad de cristales formados es proporcional a la proliferación celular, lo que incluye tanto inhibición del crecimiento como muerte celular. Para poder distinguir entre ambos efectos se realizó, simultáneamente al MTT, contaje con azul Tripán.

Las células se cultivaron a una densidad de 10^5 c/mL en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 100 μ L/pocillo y al menos 3 pocillos por punto experimental. Tras el procedimiento experimental correspondiente (tratamiento con drogas, NPs, irradiación, etc.) se añadió a cada pocillo 10 μ L de una disolución de MTT (5 mg/mL) con una pipeta de repetición. Las placas se incubaron 2-3 h a 37°C y se centrifugaron 30 min, a 2000 xg. Se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida y enérgica de la placa sobre papel de filtro. Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 μ L de DMSO con una pipeta multicanal y se agitó en una placa vibradora (Bioblock, Francia). Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas (MR5000, Dynatech) frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentaron como porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de la droga citotóxica frente al control, tras restar a todos los pocillos el blanco correspondiente (medio de cultivo sometido a los mismos procedimientos pero sin células).

3.14 Láser para irradiación NIR

La característica de las nanopartículas utilizadas, es que absorben en el infrarrojo cercano (NIR), concretamente a 1080 nm. La energía absorbida se transforma en calor que se puede utilizar como terapia (hipertermia óptica).

Para llevar a cabo los experimentos de hipertermia se utilizó un laser Ventus de onda continua acoplado a una fibra TEMoo (PAF-X-7-C, Thorlabs) operando a una potencia de salida de 1.1 W. Este laser emite a 1064 nm y las células fueron irradiadas a una potencia de 5 W/cm². Para ello las células se incubaron durante toda la noche con los nanoprismas, tras dos lavados con medio y dejándolas en medio sin rojo fenol se posicionaron enfrente del haz y se irradiaron durante diferentes tiempos.

Durante la irradiación es posible medir la temperatura del pocillo, para lo cual se utilizó un software desarrollado por la universidad de Zaragoza utilizando un termoacoplador.

3.15 Microscopía de fluorescencia confocal

Tanto para analizar la entrada de los nanoprismas en las células en el estudio de toxicidad *in vitro*, como el mecanismo de muerte celular por hipertermia, se utilizó microscopía confocal de fluorescencia.

Para ello se utilizó un microscopio confocal (Olympus FV10-i Oil Type) y el software FV101-SW para el procesamiento mínimo de las imágenes en cuanto a la eliminación de ruido de fondo y la superposición de los distintos canales de fluorescencia.

Se sembraron las células sobre cubres de 5 (Electron Microscopy Science) o 13 mm de diámetro, a una densidad de $2 \cdot 10^4$ y 10^5 cel/mL respectivamente. Tras 24h, tiempo necesario para que las células se adhieran al cobre se incubaron con 25-200 µg/mL de NPR-TG durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron con PBS y o bien se irradiaron con un láser (ver 3.14) o se fijaron directamente con PFA 4% a 4°C.

Una vez fijadas las células se pasó al marcaje con distintos anticuerpos. Para ello se permeabilizaron lavando sucesivamente con 0.1% de saponina en PBS, PBS y agua destilada y se incubaron con los anticuerpos que aparecen en la tabla 3.6 en saponina 0.1% con 5% de suero de cabra, durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo se procedió a repetir los 3 lavados. Si el anticuerpo utilizado no está marcado con una sonda fluorescente se procedió a repetir la incubación con un anticuerpo secundario de la misma manera.

Finalmente se realizó el montaje en un porta con una gota de fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Inc) que contiene 2 µg/mL Hoechst 33342 (Invitrogen).

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Especie
Lamp1	1D4B	BD	1/400	Rata
Citocromo C	6H2.B4	BD	1/100	Ratón
IgG de rata-Alexafluor 488		Invitrogen	1/500	Cabra
IgG de ratón-Alexa 633		Invitrogen	1/500	Cabra

Tabla 3.6. Anticuerpos utilizados para microscopía confocal. Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas mediante microscopía confocal y la dilución a la que se utilizaron. Los dos primeros corresponden con los anticuerpos primarios y los dos últimos con los secundarios correspondientes.

3.16 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se sembraron las células en cámara de 8 pocillos (Nunc, Lab Tek) a una densidad de $1.25 \cdot 10^5$ cél/mL y se dejaron 24 h para que se adhirieran. Se incubaron con 100 µg/mL de NPR-G durante toda la noche. Tras lavar el exceso de nanopartículas, las células fueron irradiadas (ver 3.14) y fijadas con 2.5% glutaraldehído en 0.1M de tampón fosfato, durante 5 min a 37°C y 1 h a 4°C tras cambiar el glutaraldehído. Posteriormente se lavaron 4 veces con 0,1 M tampón fosfato (5 min cada lavado). Una vez fijadas las células se guardaron en 0.1M tampón fosfato 0.05% azida de sodio a 4°C.

Las células fueron enviadas al Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia, donde procesaron las muestras y realizaron cortes de 0.08 µm. Los cortes se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai TF20 (FEI)

3.17 Determinación de oro por ICP-MS

Para determinar la cantidad de oro en los distintos órganos se procedió a congelarlos a -80°C en un volumen mínimo de agua tras varios lavados. Y se liofilizaron (Telstar cryodos) durante toda la noche. Se pesó el órgano liofilizado

y se procedió a quemarlo en un horno de cerámica a 650°C durante 1 h. Las cenizas se resuspendieron en 200 µL de agua regia (3HCl:1HNO₃) y 200 µL de solución piraña (3H₂SO₄:1H₂O₂) y se incubaron a 70°C durante 1 h para terminar de digerir los órganos. Se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 seg y se recogieron los sobrenadantes que se diluyeron hasta 20 mL en agua milli-Q y se enviaron a la unidad de espectrometría atómica del SCAB (Servicio Central de Análisis de Bizkaia).

Para determinar la cantidad de oro en la orina se procedió de la misma manera, exceptuando el paso del quemado en el horno de cerámica, ya que las muestras tras la liofilización ya eran un polvo que se digirió directamente con los ácidos. Y para determinar el oro en las heces, tras la dilución en agua milli-Q se filtraron los restos con papel de filtro.

3.18 Cuantificación del TAMRA en los nanoprismas por fluorimetría

Para determinar la cantidad de TAMRA que está unido a los NPR-TG, tras su funcionalización se centrifugaron a 9000 rpm en la minispin de Eppendorf durante 6 min y se recogieron los sobrenadantes de los lavados. Se incubaron los NPR-TG con PBS, agua, SFB, plasma, glutation 1 y 100 µM durante 24 h a 37°C y en agitación y tras centrifugarse se recogieron los sobrenadantes y se analizó su fluorescencia. Para ello se utilizó un fluorímetro perkin Elmer excitando a 544 nm y recogiendo la emisión entre 500 y 700 nm y se consideró el dato de emisión máxima que sale en torno a 580 nm.

Algunos sobrenadantes fue necesario diluirlos, entre 1/1000 (los sobrenadantes tras la funcionalización) a 1/10 (los obtenidos al incubar los NPR-TG con agua).

Se realizó una recta de calibrado utilizando la solución de TAMRA preparada para la funcionalización, a partir de la que se hicieron diluciones seriadas. De esta manera el TAMRA de la recta de calibrado se encuentra el mismo tiempo en solución que el que está en los NPR-TG. De esta forma es posible cuantificar la cantidad de TAMRA que se suelta en los sobrenadantes.

3.19 Toxicidad y biodistribución de NPs *in vivo*

Los procedimientos experimentales que se detallan a continuación están aprobados por el comité ético de investigación animal de la Universidad de Zaragoza, bajo el número PI06/14 y se realizaron en las instalaciones del animalario del CIBA.

Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos *in vivo*. El primero de ellos con el objetivo de estudiar la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas *in vivo* y el segundo para analizar la acumulación de las nanopartículas en los tumores. Para ello se utilizaron dos tipos de nanoprismas y dos cepas distintas de ratones, aunque los procedimientos de inoculación de los nanoprismas y la toma de muestras fueron los mismos en ambos casos.

3.19.1 Concentración de NPs

Las NPs que se inyectaron vía intravenosa (i.v) fueron NPR-TG y NPR-G. Se inyectó 150 µg de nanoprismas en hembras y 225 µg en machos, cantidad que corresponde con una concentración entre 75 y 85 µg/mL (en sangre) teniendo en cuenta el volumen de sangre del ratón. Esta concentración se encuentra dentro del rango de concentraciones utilizado para el análisis de toxicidad *in vitro*, así como se aproxima al utilizado para el estudio de hipertermia que fue de 100 µg/mL.

Para ello se centrifugaron los nanoprismas durante 6 min a 9000 rpm y se resuspendieron en PBS a una concentración de 1,5 mg/mL. Se inocularon 100 µL en hembras y 150 µL en machos en la vena lateral de la cola, previa vasodilatación con luz IR, para ello se inmovilizaron en un cepo y se utilizó una aguja de 25G para la inyección intravenosa. Al grupo control se les administró el mismo volumen de PBS.

3.19.2 Modelo animal

Para analizar la toxicidad y biodistribución de las nanopartículas *in vivo* se utilizaron ratones swiss, machos y hembras de 6 - 7 semanas de edad entre 24-31 g. Estos ratones no son consanguíneos y son muy utilizados para los estudios de toxicidad.

Se establecieron dos grupos, uno de ellos para el estudio de toxicidad aguda que duró 3 días y otro de toxicidad crónica que se llevó a cabo durante 4 meses. En el estudio de toxicidad aguda se mantuvieron los ratones en jaulas metabólicas durante los 3 días y se recogió la orina y heces cada 24 h. En el estudio de toxicidad crónica, se mantuvieron en sus jaulas habituales y se hizo un seguimiento del peso semanalmente.

3.19.3 Toma de muestras

En todos los casos tras la finalización del periodo experimental se sacrificaron los ratones en cámara de CO₂ y se procedió a extraer la sangre y los órganos/tumores para su posterior análisis.

- **Suero:** La sangre se extrajo por inyección intracardiaca, con un 10% de citrato sódico como anticoagulante. Se centrifugó 2000 xg durante 15 min para obtener el suero que se congeló a -80°C hasta su análisis.

El análisis bioquímico de las muestras se llevó a cabo en el Hospital Universitario Lozano Blesa de Zaragoza gracias a la generosa participación del Dr. Sebastian Meco del servicio de toxicología.

- **Órganos/Tumores:** Tras la extracción los órganos/tumores se pesaron, se lavaron en PBS para eliminar la sangre y se tallaron para separarlos en los dos grupos; para anatomía patológica y para la cuantificación de las nanopartículas por ICP.

- Anatomía patológica: Se fijaron en PFA 4% durante 24h a 4°C. Periodo tras el cual se pasaron a EtOH al 70% y se entregaron al servicio de anatomía patológica del CIBA para su procesado en bloques de parafina y tinción HE (hematosilina/eosina) o con DAPI. Los cortes fueron analizados por el Dr. Marcelo de las Heras en la facultad de veterinaria.
- ICP: Se lavaron con H₂O destilada y congealaron a -80°C hasta su procesado, que viene detallado en el apartado 3.17.
- TEM: Se lavaron con H₂O destilada y fijaron en 2.5% glutaraldehído en 0.1M de tampón fosfato 24h a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 4 veces con tampón fosfato 0.1M pH 7 durante media hora y fueron enviadas al Centro de Investigación Principe Felipe (CIPF) de Valencia, donde procesaron las muestras y realizaron cortes de 0.08 µm. Los cortes se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Titan corregido de imagen y las imágenes fueron tomadas por una cámara CCD de GATAN a 80KV de HT.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1 Nanoprismas de oro (NPRs)

Dentro de la amplia variedad de NPs que se han desarrollado en los últimos años, elegimos las AuNPs por ser las más estables y eficientes transformando la energía absorbida en calor [294]. Y más concretamente, con forma de prisma, ya que presentan su banda de plasmón de resonancia en el NIR [31]. Esto es muy importante ya que se encuentra en lo que se conoce como ventana biológica, que es un rango de longitudes de onda en el que los tejidos son transparentes y no absorben, alcanzando la irradiación gran penetrancia [11].

Las NPs utilizadas en el desarrollo de esta tesis fueron sintetizadas por la Dra. Beatriz Pelaz, el Dr. Pablo del Pino y el Dr. Scott G. Mitchell. Su síntesis, caracterizada previamente [31], se lleva a cabo reduciendo una sal de oro (HAuCl_2) con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en dos pasos, como está detallado en materiales y métodos. Tras su síntesis se derivatizan con el polímero PEG para aumentar su estabilidad coloidal y se separan las distintas formas por electroforesis. En resumen, son AuNPs en forma de prisma (AuNPRs) recubiertas de PEG. En la figura 4.1 se observa (A) una fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los AuNPRs con (B) una distribución media de 150 nm de arista y 10 nm de grosor. Con esta forma y tamaño, la banda de plasmón de resonancia se encuentra a 1080 nm (Fig 4.1C).

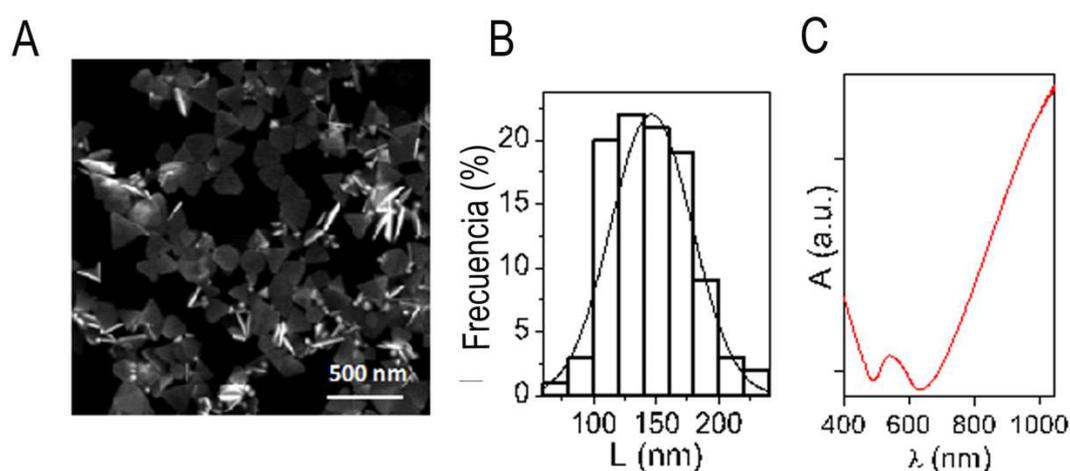


Figura 4.1. Caracterización de los NPRs. A) SEM. B) Distribución de la longitud de las nanopartículas (L) de media 146.2 ± 32.4 nm. C) Espectro UV-visible.

4.1.1 Funcionalización de los NPRs

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado 5 tipos de AuNPRs, con diferentes funcionalizaciones, todos ellos recubiertos con PEG. Además de proporcionar estabilidad coloidal, el PEG presenta grupos reactivos (HS-PEG-

COOH) a través de los cuales se mantiene por un lado (-SH) unido al núcleo de oro mediante un enlace S-Au y por el otro (-COOH) a diversas moléculas (a través de los grupos amina de los correspondientes ligandos) (figura 4.2).

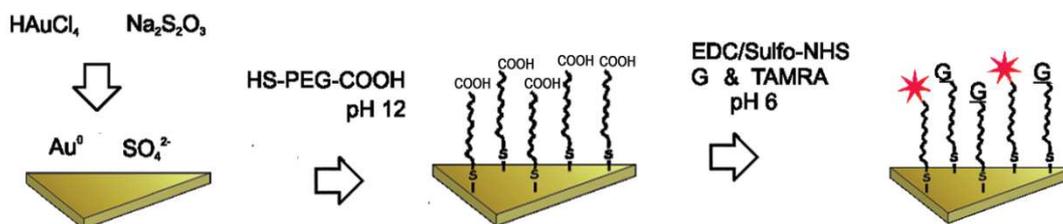


Figura 4.2. Síntesis y funcionalización de los NPRs. Síntesis del núcleo por reducción de sal de oro utilizando como agente reductor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Derivatización con PEG mediante enlace S-Au y posterior funcionalización con el fluoróforo correspondiente (★) (Alexa 647 o TAMRA) y glucosa (G) tras la activación del grupo carboxilo con EDC/sulfo-NHS [31].

A continuación se resumen los tipos de NPRs utilizados en esta tesis;

- **NPR:** Nanoprismas sólo con PEG
- **NPR-G:** Nanoprismas que además de PEG llevan Glucosa (G) para facilitar la internalización de la nanopartícula dentro de la célula.
- **NPR-T:** Nanoprismas con PEG y el fluoróforo 5-TAMRA cadaverina (TAMRA, T) que permite la visualización de la nanopartícula por microscopía de fluorescencia.
- **NPR-TG:** Nanoprismas recubiertos de PEG y funcionalizados simultáneamente con TAMRA (T) y glucosa (G)
- **NPR-AG:** Nanoprismas recubiertos de PEG, funcionalizados con glucosa (G) y con el fluoróforo Alexa 647 (A), para su estudio por citometría de flujo (debido a que el citómetro utilizado carece del láser adecuado para excitar el fluoróforo tamra).

Es necesario aclarar que al hablar de los nanoprismas en conjunto, se utilizará el término AuNPRs, al referirnos a las nanopartículas de oro sin especificar la forma se utilizará el término AuNPs y para nanopartículas en general se utilizará el término NPs.

4.2 Estudio del uso de AuNPRs para terapia fototérmica (PTT).

Como ya se explicó en antecedentes y objetivos los trabajos sobre PTT son poco precisos, siendo la necrosis la forma más común de inducir muerte celular. Algunos estudios han visto diferentes respuestas ajustando los parámetros de intensidad de radiación tanto para hipertermia magnética [342, 364], como óptica [365]. Sin embargo, no quedan claras las respuestas a nivel molecular, es decir los mecanismos desencadenados. Por lo que nos planteamos utilizando los AuNPRs, modular la muerte celular producida por PTT para inducir apoptosis, estudiar su cinética y el mecanismo de muerte implicado. Esto es especialmente importante ya que muchas células tumorales han adquirido resistencias y son capaces de evadir la apoptosis [35, 366].

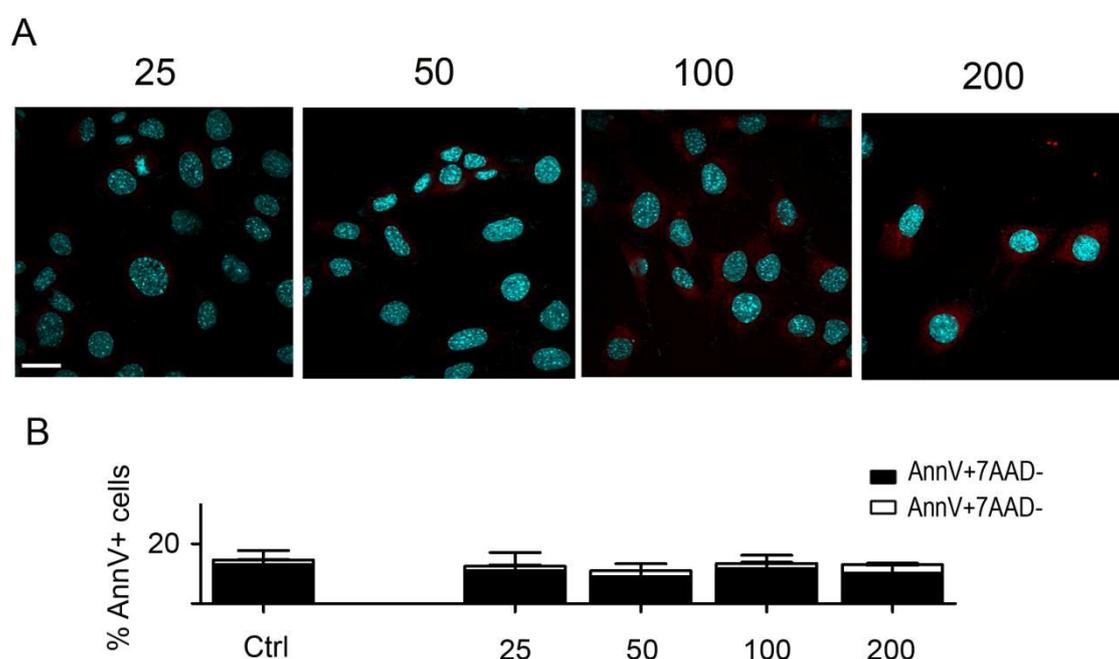


Figura 4.3: Internalización de NPR-TG y toxicidad en células MEF. Se incubaron células MEF con cantidades crecientes de NPR-TG (25, 50, 100 and 200 µg/mL) durante toda la noche, tras lavar el exceso **(A)** se fijaron con PFA 4% y teñieron con Hoechst 3342. Se muestra una imagen representativa obtenida mediante microscopía de fluorescencia confocal. Se puede observar el núcleo en azul y los NPR-TG en rojo. Escala: 25 µm. **(B)** En paralelo se determinó la muerte celular mediante marcaje con las sondas AnnV y 7AAD. Todo ello como se indica en materiales y métodos.

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron células MEF transformadas con el virus sv40, de las que contamos con varios mutantes de proteínas implicadas en la vía intrínseca de la apoptosis. Las células se incubaron con 100 µg/mL de nanoprismas con glucosa (NPR-G), durante toda

la noche y previo lavado del exceso de AuNPRs se irradiaron con un láser a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² como se explica en materiales y métodos (apartado 3.14) durante diferentes tiempos. Las células se incubaron e irradiaron en placas de 96 pocillos en las que el diámetro del haz del laser coincide con el del pocillo, por lo que todas las células fueron irradiadas.

Se eligió la concentración de 100 µg/mL por ser la concentración a la cual la entrada de AuNPRs es elevada, pero sin comprometer la viabilidad celular (figura 4.3). La entrada de los AuNPRs en la célula se determinó incubándolas con cantidades crecientes de NPR-TG (25-200 µg/mL) durante toda la noche y se analizó por microscopía de fluorescencia confocal como se detalla en materiales y métodos (apartado 3.15). La viabilidad celular se analizó por citometría de flujo utilizando el marcaje AnnV/7AAD como se indica en materiales y métodos (apartado 3.11.1)

4.2.1 Estudio del tipo de muerte celular inducida por PTT

Tras la excitación mediante radiación a la longitud de onda apropiada las AuNPs producen calor por conversión de la luz absorbida, actuando como nanocalentadores. La forma de calentar (gradual y lenta o rápida) y la duración influyen en la respuesta [367]. Además, la mayoría de los experimentos se llevan a cabo a temperatura ambiente [16, 17], cuando sería más interesante realizar las irradiaciones a 37°C para posibles aplicaciones biomédicas y para los estudios *in vivo*. Por todo ello, se monitorizó la temperatura del cultivo al irradiar durante 10 min a temperatura ambiente (RT) o a 37°C células MEF incubadas con NPR-G. Como se observa en la figura 4.4 A, la temperatura aumenta 12°C en los dos casos. Este incremento de temperatura es muy rápido al principio ($\Delta T > 5^\circ\text{C}$ en el primer minuto) alcanzándose un máximo de saturación a los 4 min (a partir de ahí $\Delta T < 1^\circ\text{C}$). Aunque la ΔT y la curva de calentamiento son similares en ambos casos, la temperatura final que se alcanza no es la misma, llegando a 41°C al irradiar a RT frente a los 50°C que se alcanzan al irradiar a 37°C. Analizando la muerte celular por citometría de flujo 5 h después de la irradiación (figura 4.4 B), se puede observar que se produce muerte únicamente en las células irradiadas a 37°C. Por lo tanto la temperatura que se alcanza a RT (41°C) no es suficiente para matar a las células, mientras que al irradiar a 37°C (alcanzando 50°C) a las 5 h hay un 58% de células muertas.

Con estos resultados establecimos la temperatura de las posteriores irradiaciones a 37°C, que además de mimetizar las condiciones biológicas, ofrece resultados más reproducibles.

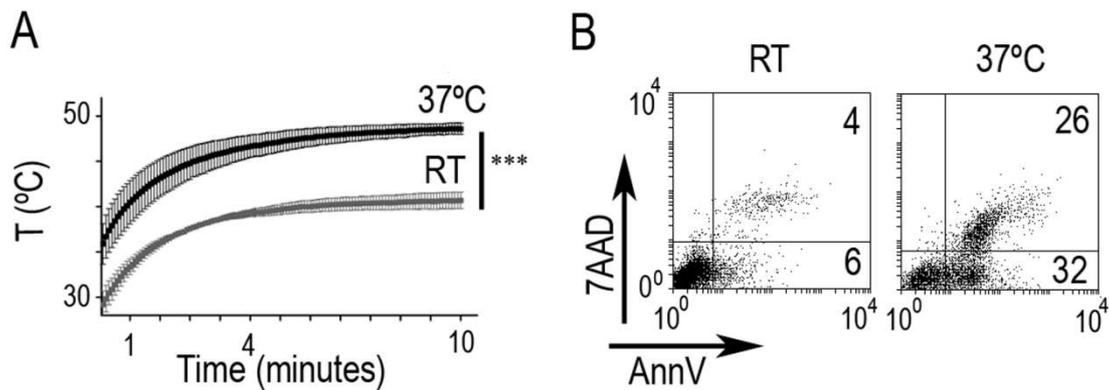


Figura 4.4: Efecto de la temperatura en la viabilidad de células MEF incubadas con AuNPR e irradiadas con láser en el NIR (1064 nm). Se incubaron células MEF con 100 µg/mL NPR-G durante toda la noche y tras lavar el exceso se irradiaron durante 10 min a temperatura ambiente (RT) o a 37°C con una potencia de 5 W/cm². **(A)** Se midió la temperatura durante los 10 minutos de la irradiación y **(B)** se analizó la muerte celular por citometría de flujo a las 5 h de la irradiación, mediante las sondas AnnV y 7AAD. Todo ello como se explica en materiales y métodos. En los diagramas de puntos representativos los números corresponden con el porcentaje de células en cada cuadrante. El inferior corresponde a las células AnnV⁺7AAD⁻ y el superior a las células AnnV⁺7AAD⁺. Estadística mediante t-student ***p<0.0001.

El siguiente paso fue analizar si la muerte se produce por necrosis o apoptosis. Debido a la ausencia de macrófagos en los ensayos *in vitro*, las células apoptóticas no son digeridas por éstos, por lo que con el paso del tiempo acaban por perder la integridad de la membrana y pasan a tener un fenotipo necrótico. Así es necesario distinguir entre necrosis primaria, que es aquella en la que la célula se muere por necrosis y la necrosis secundaria, en la que las células se mueren por apoptosis pero tienen un fenotipo necrótico a tiempos largos, debido a la ausencia de macrófagos. Para distinguirlas, la necrosis secundaria va precedida en el tiempo por un fenotipo apoptótico, mientras que la necrosis primaria no. Para poder analizar en detalle el tipo de muerte celular, es necesario un estudio de la cinética de la traslocación de la PS (AnnV) y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (7AAD).

Para ello irradiamos las células MEF durante 30 seg, 2, 4 o 10 min y analizamos la muerte a distintos tiempos. Como se muestra en la figura 4.5 A, 1 h después de la irradiación durante 30 seg, 2 y 4 min no se observa muerte, al contrario de otros estudios en los que las células mueren en menos de 1 h con evidente ruptura de la membrana [365, 368]. El porcentaje de células apoptóticas (AnnV⁺7AAD⁻) y necróticas (AnnV⁺7AAD⁺) aumenta a tiempos de incubación mayores (5, 12 y 18 h). Parece evidente que las células primero tienen fenotipo apoptótico y con el tiempo pierden la integridad de la membrana lo que indica una necrosis secundaria. Esta observación viene respaldada

porque (1) las células irradiadas 30 seg a las 18 h muestran un fenotipo apoptótico prácticamente en su totalidad, (2) las células irradiadas 10 min a la hora muestran un fenotipo apoptótico y con el tiempo (5 y 12 h) va aumentando el % de células necróticas, sin prácticamente aumentar el % total de células muertas, (3) no se observan células marcadas solamente con 7AAD, todas las que han perdido integridad de la membrana, presentan el marcaje de AnnV.

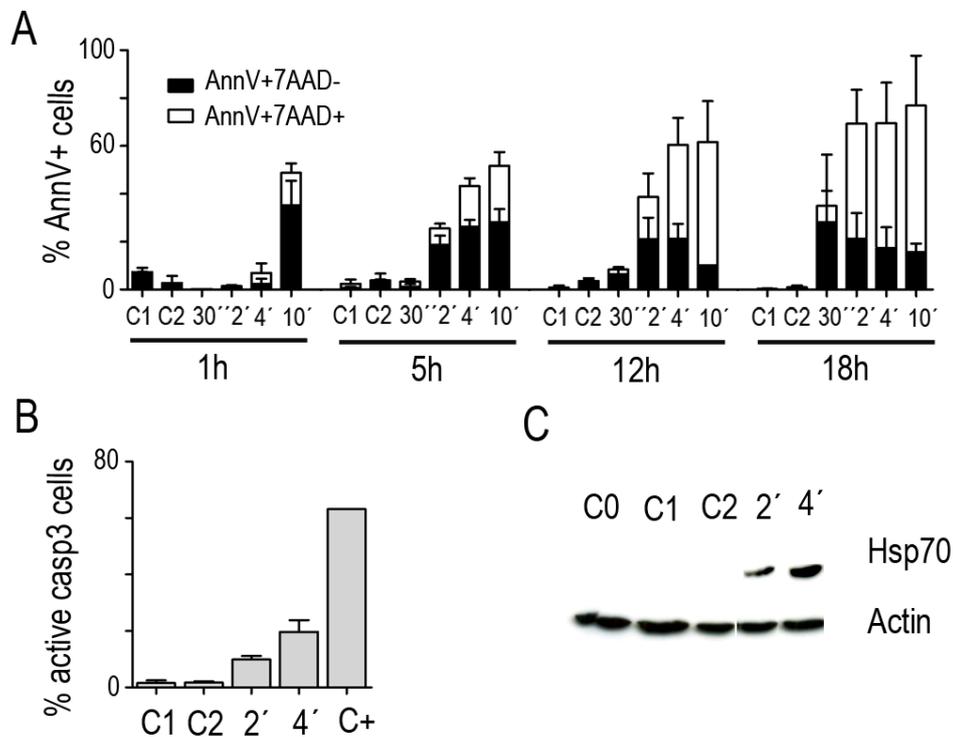


Figura 4.5: Estudio del tipo de muerte celular tras la irradiación de células MEF incubadas con NPR-G. Se incubaron células MEF con 100 µg/mL NPR-G durante toda la noche. Tras lavar el exceso de NPR-G, se irradiaron a 1064 nm durante 30 seg, 2, 4 o 10 min (30'', 2', 4' y 10') con una potencia de 5 W/cm². **(A)** Se analizó la muerte celular por citometría de flujo 1, 5, 12 y 18 h después de la irradiación, utilizando las sondas AnnV y 7AAD. **(B)** Se analizó la activación de la caspasa 3 por citometría de flujo 5 h después de la irradiación, utilizando un anticuerpo que reconoce el fragmento activo de la caspasa 3. **(C)** Se analizó la expresión de proteínas de choque térmico (Hsp70) mediante inmunoblot. Todo ello como se explica en materiales y métodos. La actina (actin) sirve como control de carga. C0: control células. C1: células incubadas con NPR-G sin irradiar. C2: células sin NPR-G irradiadas. C+: células incubadas con estaurosporina. En las gráficas se representa la media ± SEM de un mínimo de 3 experimentos independientes.

Todos estos datos sugieren que bajo las condiciones utilizadas las células sufren un proceso apoptótico, que finalmente genera necrosis secundaria. Además podemos observar que la extensión de la muerte celular se puede modular simplemente cambiando el tiempo de irradiación. Así mismo el mecanismo de muerte parece estar influenciado por la intensidad de la

radiación, ya que resultados previos con estos mismos AuNPRs pero con mayor potencia de irradiación (30 W/cm^2), muestran células con un fenotipo necrótico inmediatamente después de la irradiación [31].

Para confirmar que el mecanismo de muerte es apoptótico, se analizó un marcador específico, la caspasa 3 (ver apartado 2.1.1.1.1) 5 h después de la irradiación. A este tiempo es cuando se observa un 30-50% de muerte y la mayoría de las células presentan fenotipo apoptótico. Los resultados obtenidos (figura 4.5 B) se correlacionan con los previos (figura 4.5 A). Por ejemplo, el 30% de las células irradiadas durante 4 min presentan activación de la caspasa 3, lo que corresponde al % de células con fenotipo apoptótico (AnnV+7AAD-). Estos resultados confirman la apoptosis como el mecanismo por el cual se produce la muerte celular.

De acuerdo a estos resultados, se establecieron las condiciones para los siguientes experimentos; se irradiaron las células con una potencia de 5 W/cm^2 durante 2 y 4 min y se analizaron los diferentes parámetros 5 h después de la irradiación.

Para confirmar que este tratamiento induce hipertermia, se analizó la expresión de proteínas de choque térmico (Hsp70s) por inmunoblot como se explica en materiales y métodos (apartado 3.10.1.4). Estas proteínas son sintetizadas por la célula para su protección, en respuesta al estrés térmico u oxidativo [369]. La figura 4.5 C muestra una dependencia de la expresión de Hsp70s en función del tiempo de irradiación.

4.2.2 Mecanismo molecular de muerte celular inducida por PTT

Anteriormente hemos visto que la PTT induce apoptosis en células MEF a las condiciones indicadas. A continuación se analizó el mecanismo molecular implicado en dicho proceso. Para ello se incubaron diferentes mutantes de células MEF obtenidas de ratones "Knock out" en los cuales no se expresan proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 (MEF BakBax^{-/-} y MEF Bid^{-/-}) o caspasas (MEF casp9^{-/-} y MEF casp3^{-/-}). Todas estas proteínas están implicadas en la vía mitocondrial de apoptosis (ver apartado 2.1.1.2.1) y como muestra la figura 4.6 A, 5 h después de la irradiación en ninguno de los mutantes se observa muerte, pero sí en las células MEF de fenotipo silvestre (wt). Como cabe esperar, la apoptosis inducida por la estaurosporina (Stp) (utilizada como control que activa la vía mitocondrial de forma independiente de Bid) [357] queda completamente bloqueada en los MEF casp3^{-/-}, MEF casp9^{-/-} y MEF BakBax^{-/-} pero no en MEF Bid^{-/-} ni MEF wt. Por el contrario el etanol (EtOH) induce necrosis en todas las líneas (figura 4.6 B). Estos datos confirman que las células están muriendo por apoptosis bajo PTT utilizando

AuNPRs, ya que si fuera necrosis, estos mutantes morirían igual que con EtOH.

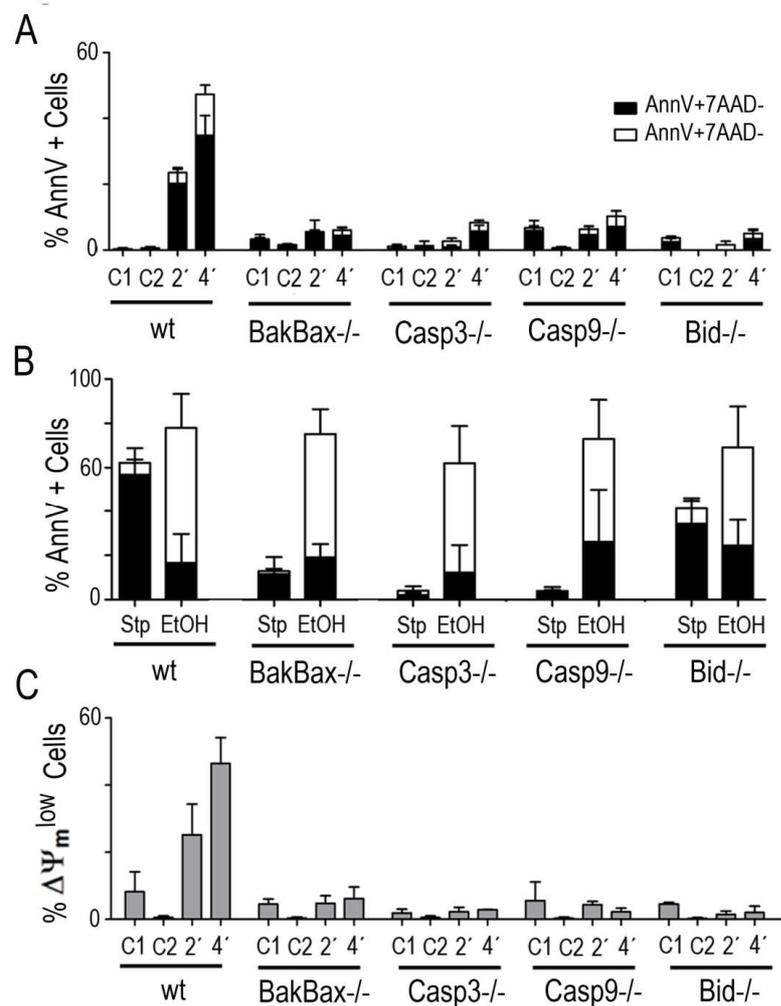


Figura 4.6: Análisis del mecanismo de apoptosis inducida al irradiar células MEF incubadas con NPR-G. Se incubaron células MEF wt o mutantes carentes de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 o caspasas (MEF BakBax^{-/-}, MEF Bid^{-/-}, MEF cas9^{-/-} y MEF casp3^{-/-}) con 100 µg/mL NPR-G durante toda la noche y tras lavar el exceso, se irradiaron a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² durante 2 o 4 min (2' o 4'). **(A y B)** Se analizó la muerte celular por citometría de flujo 5 h después de la irradiación, utilizando las sondas AnnV y 7AAD. Como control de apoptosis se utilizó estaurosporina (stp) y de necrosis etanol (EtOH). **(C)** Se analizó la caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometría de flujo utilizando la sonda DIOC₆. Todo ello como se indica en materiales y métodos. C1: células incubadas con NPR-G sin irradiar. C2: células irradiadas sin NPR-G. En las gráficas se representa la media \pm SEM de un mínimo de 3 experimentos independientes.

Para confirmar el papel de la mitocondria en el mecanismo de apoptosis se investigó el daño mitocondrial tras la irradiación, monitorizando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometría de flujo. Como se observa en la figura 4.6 C, todos los mutantes mantienen intacto su $\Delta\Psi_m$ tras la

irradiación, mientras que los MEF wt irradiados 4 min presentan un 50% de caída de $\Delta\Psi_m$ lo que está perfectamente correlacionado con el marcaje de AnnV (figura 4.5 A y 4.6 A). Estos resultados apoyan la hipótesis de la implicación de la mitocondria en el mecanismo de apoptosis.

La entrada de los NPR-G en todos los mutantes fue similar (figura 4.7), lo que confirma que la resistencia a la apoptosis no se debe a diferencias en la internalización de los NPR-G, si no a la falta de la proteína proapoptótica en cada caso

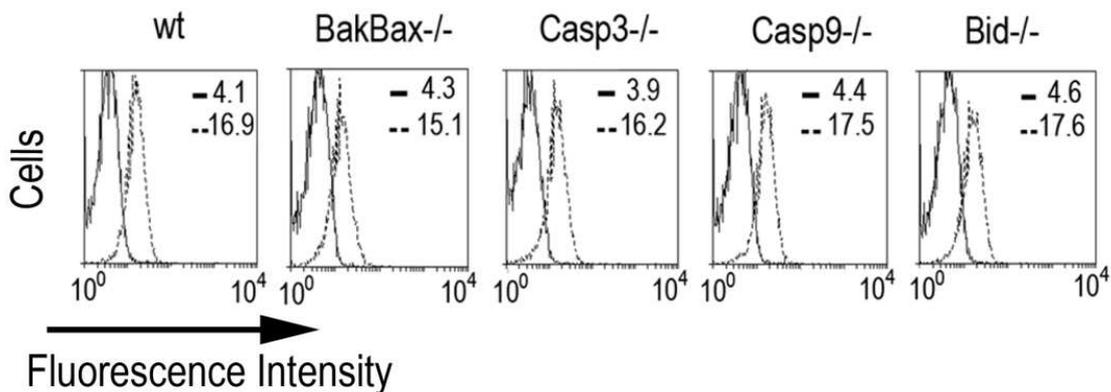


Figura 4.7: Internalización de los AuNPRs en las células MEF. Se incubaron células MEF wt y los distintos mutantes con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPR-AG durante toda la noche. Tras lavar el exceso, se analizó la fluorescencia por citometría de flujo como se indica en materiales y métodos. Los números corresponden a la intensidad media de fluorescencia. Línea continua: control. Línea discontinua: NPR-AG

La resistencia de los mutantes a la apoptosis inducida por PTT utilizando NPR-G, parece indicar que la vía mitocondrial de la apoptosis está activada por la proteína sólo-BH3 Bid (ver apartado 2.1.1.1.2). Bid activaría la oligomerización de Bak y Bax, permitiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, lo que proporcionaría la salida del citocromo C y la consecuente activación de la caspasa 9 y posteriormente la caspasa 3. Con esta hipótesis la resistencia a la caída de $\Delta\Psi_m$ de las células MEF casp9^{-/-} y MEF casp3^{-/-} no es sorprendente desde que se describió la necesidad de activación de la caspasa 3 para producir un "loop" de amplificación que induce a la caída irreversible y completa de $\Delta\Psi_m$ [107].

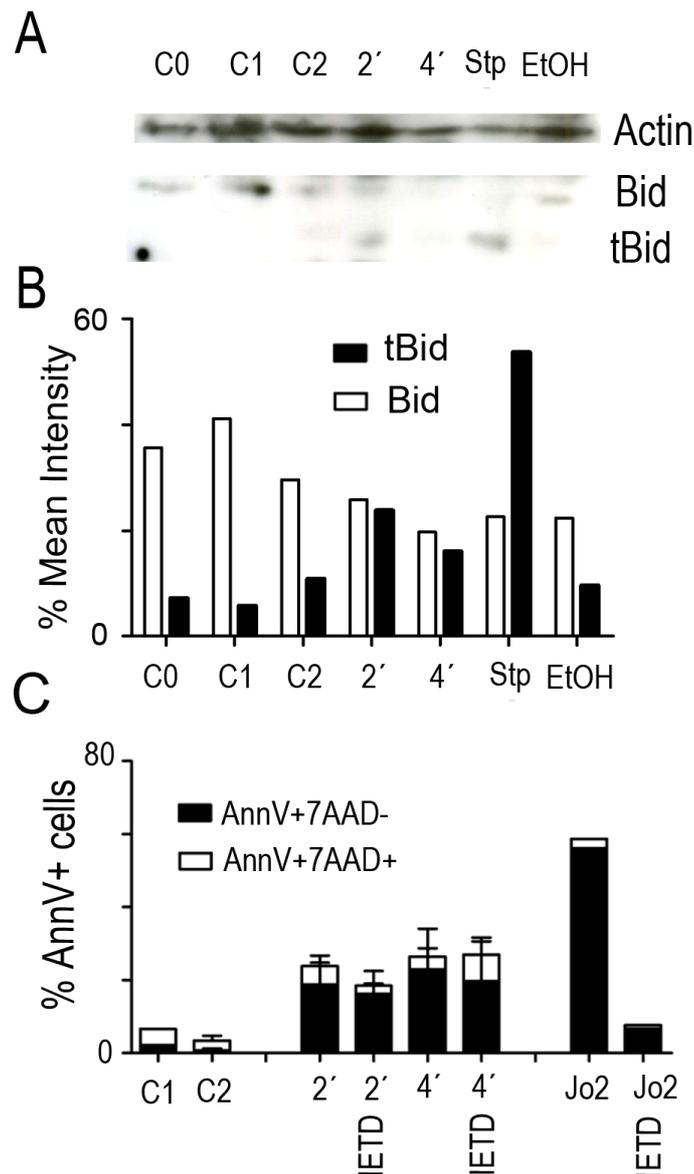


Figura 4.8: Activación de Bid durante la irradiación de células MEF incubadas con NPR-G. Se incubaron células MEF wt con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-G durante toda la noche y tras lavar el exceso, se irradiaron a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm^2 durante 2 o 4 min (2' o 4'). **(A)** Se analizó la activación de Bid por inmunoblot 5 h después de la irradiación. Bid corresponde a la forma inactiva mientras que tBid corresponde al fragmento activo. Se utilizó actina como control de carga. **(B)** Se cuantificó por densitometría las bandas de Bid y tBid. En la gráfica se representa el porcentaje de intensidad respecto a la actina. **(C)** Se analizó la muerte celular en presencia o ausencia del inhibidor de caspasa 8 (IETD) mediante citometría de flujo utilizando las sondas AnnV y 7AAD. El anticuerpo Jo2 fue usado como control de apoptosis mediada por caspasa 8. En la gráfica se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes excepto con el anticuerpo Jo2 que solo se hizo 1. Todo ello como se indica en materiales y métodos. Como control de apoptosis se utilizó estaurosporina (stp) y de necrosis, etanol (EtOH). C0: control células. C1: células incubadas con NPR-G sin irradiar. C2: células sin NPR-G irradiadas.

Nuestros resultados sugieren que Bid presenta un papel principal en este mecanismo, por lo que se analizó su activación. Tras el estímulo apoptótico Bid es cortado generando un fragmento (tBid) que se trasloca a la mitocondria e induce la oligomerización de Bak y/o Bax activando la ruta intrínseca de la apoptosis [370]. Como se muestra en la figura 4.8 A, PTT produce la generación de tBid, que se observa de forma más evidente cuando se irradia 2 min. La cuantificación por densitometría (figura 4.8 B) muestra más claramente que la aparición de tBid viene acompañado por disminución de Bid. Como control, la apoptosis inducida por estaurosporina también va acompañada de activación de Bid, mientras que la necrosis inducida por etanol no produce tBid como cabría esperar.

La estaurosporina también produce tBid, pero sin embargo las células MEF Bid^{-/-} mueren al incubarlas con esta droga al mismo nivel que las MEF wt, lo que significa que Bid es prescindible en la apoptosis inducida por estaurosporina, como sugieren trabajos previos [371]. Sin embargo, la apoptosis desencadenada por PTT necesita de Bid, aunque la forma en que es procesado no queda clara.

Típicamente Bid es activado por la caspasa 8 durante la vía extrínseca de la apoptosis que se activa por la unión del ligando mortal a su receptor [112]. Para analizar si la caspasa 8 está implicada en la activación de Bid, se incubaron las células MEF wt con NPR-G y antes de ser irradiadas se trataron con un inhibidor de la caspasa 8 (IETD) [77]. Como se muestra en la figura 4.8 C, el inhibidor no protege de la muerte inducida por PTT, mientras que protege completamente si se utiliza como estímulo Jo2. Jo2 es un anticuerpo anti-Fas que se une a este receptor y lo activa, por lo tanto induce apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 [372]. Lo utilizamos por lo tanto como control de la eficacia del inhibidor IETD .

Estos resultados nos indican que la caspasa 8 no es la responsable de la activación de Bid durante la muerte inducida por PTT.

4.2.3 Papel de los lisosomas en el mecanismo de apoptosis inducida por PTT con AuNPRs

Aunque el mecanismo por el cual Bid es activado no queda claro en este trabajo, se analizaron por microscopía de fluorescencia las células antes y tras la irradiación. Para ello se incubaron células MEF wt con NPR-TG durante toda la noche y tras la irradiación de 4 min se fijaron en PFA 4% y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal a distintos tiempos. Para analizar la colocalización de los NPR-TG se tiñieron los núcleos (azul) y los lisosomas (verde) con un anticuerpo que reconoce la proteína Lamp-1 que se localiza en la membrana de los lisosomas (3.15).

Como se puede ver en la figura 4.9, los nanoprismas se localizan en los lisosomas (C1). Aunque se observa algún lisosoma sin NPR-TG (verde), todos los NPR-TG están en los lisosomas (colocalización amarillo-naranja). Nada más irradiar (t0) observamos la fluorescencia de los NPR-TG (roja) en el citosol de la célula, aunque aún podemos observar NPR-TG en algún lisosoma. Progresivamente los NPR-TG se liberan de los lisosomas (t1) hasta que a las 5 h (t5) prácticamente no quedan NPR-TG en los lisosomas. Estos resultados indican que la irradiación causa la liberación de los NPR-TG de los lisosomas, lo que sugiere que la permeabilización lisosomal puede estar implicada en la muerte celular.

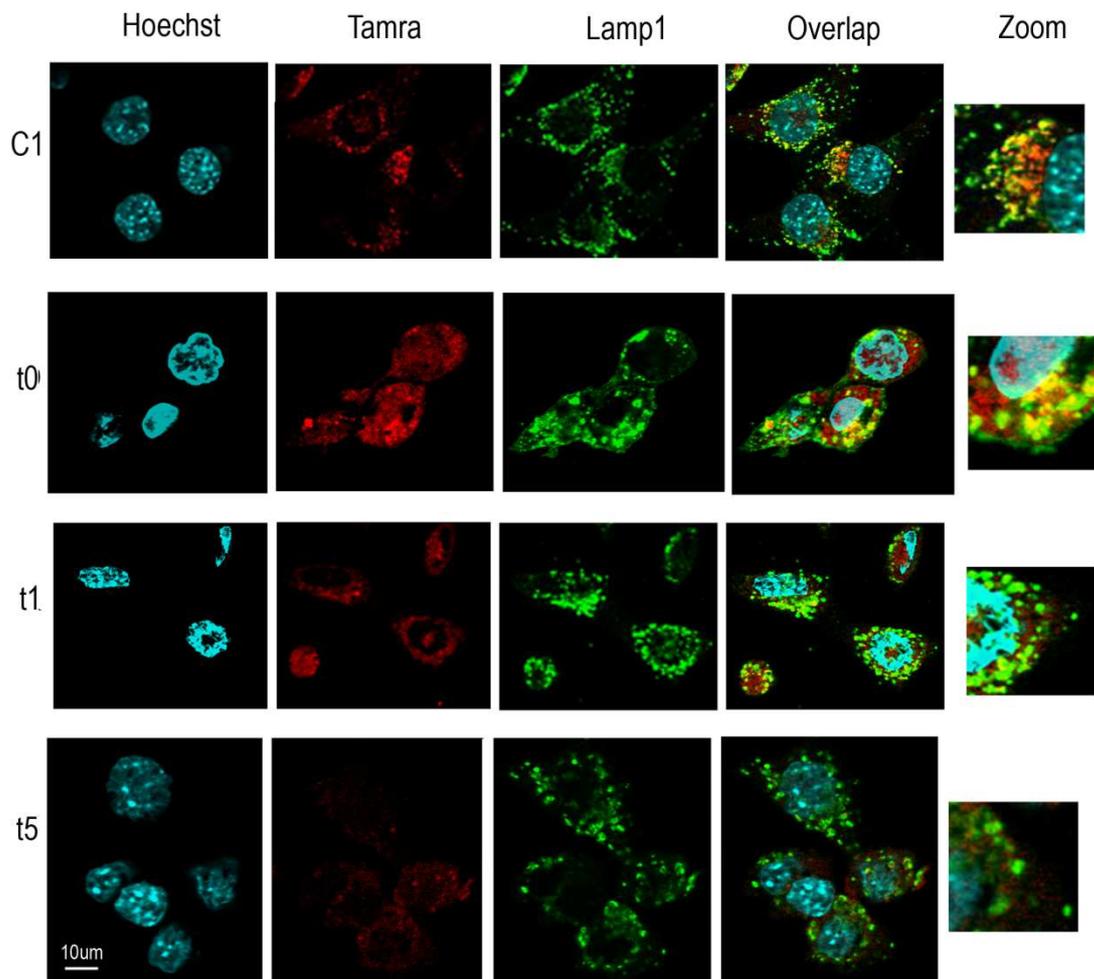


Figura 4.9: Análisis de la localización intracelular de los NPR-TG. Se incubaron células MEF wt con 100 µg/mL NPR-TG durante toda la noche y tras lavar el exceso se irradiaron con un láser a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² durante 4 min. Tras la irradiación (t0) o después de 1 h (t1) y 5 h (t5) se fijaron en PFA 4%, se tiñeron con Hoechst 3342 (DNA) y anti-Lamp1 (lisosoma) y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal como se detalla en materiales y métodos. C1: células con NPR-TG sin irradiar. A la derecha se muestran zonas específicas ampliadas.

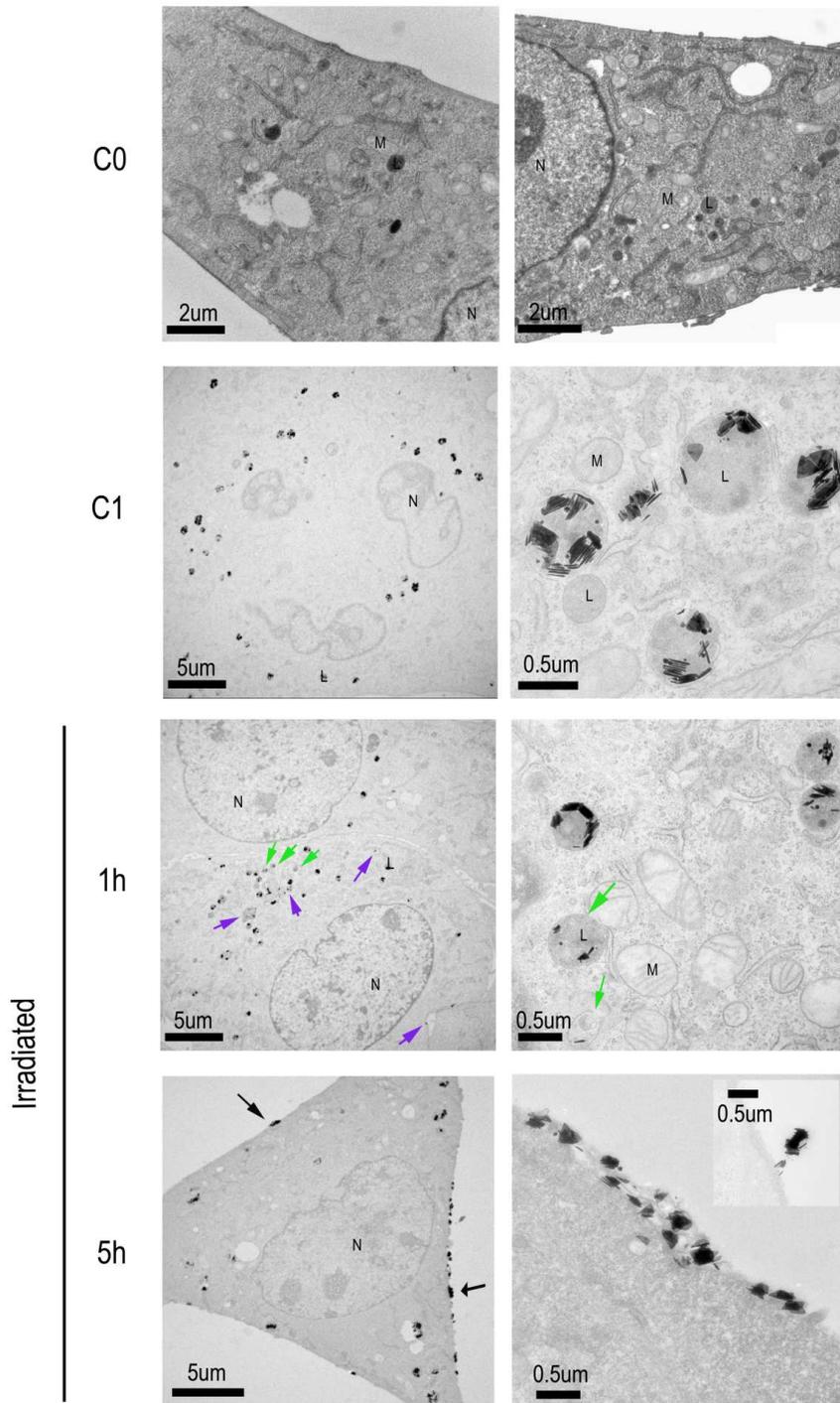


Figura 4.10: Análisis de la localización intracelular de NPR-G en células MEF por microscopía electrónica de transmisión. Se incubaron células MEF wt con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante toda la noche, tras lavar el exceso se irradiaron a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm^2 durante 4 min. Tras 1h (t1) y 5h (t5) fueron fijadas con glutaraldehído y se procesaron para TEM como se detalla en materiales y métodos. Se observan NPR-G en lisosomas (flechas verdes), en el citosol (flechas violetas) y fuera de la célula (flechas negras). C0: Control células. C1: Control células con NPR-G sin irradiar. N: núcleo. M: mitocondria. L: lisosoma.

Posteriormente se incubaron las células con NPR-G y se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) siguiendo el mismo procedimiento que para microscopía confocal. Como se muestra en la figura 4.10, los NPR-G se localizan en los lisosomas (C1) (se pueden distinguir los lisosomas de los demás endosomas, debido a su mayor contraste). Estos resultados confirman que la localización de los AuNPRs no se ve afectada por el fluoróforo. En concordancia con los resultados previos (figura 4.9), tras 1 h (t1) de la irradiación los NPR-G se liberan de los lisosomas lo que se observa en mayor proporción a las 5 h (t5). Estos resultados confirman que la fluorescencia en el citosol tras la irradiación se debe a la liberación de los AuNPRs y no solo el fluoróforo. Además se puede observar que los NPR-G son liberados de la célula y agregan en el medio, lo que explica que la fluorescencia vaya disminuyendo con el tiempo.

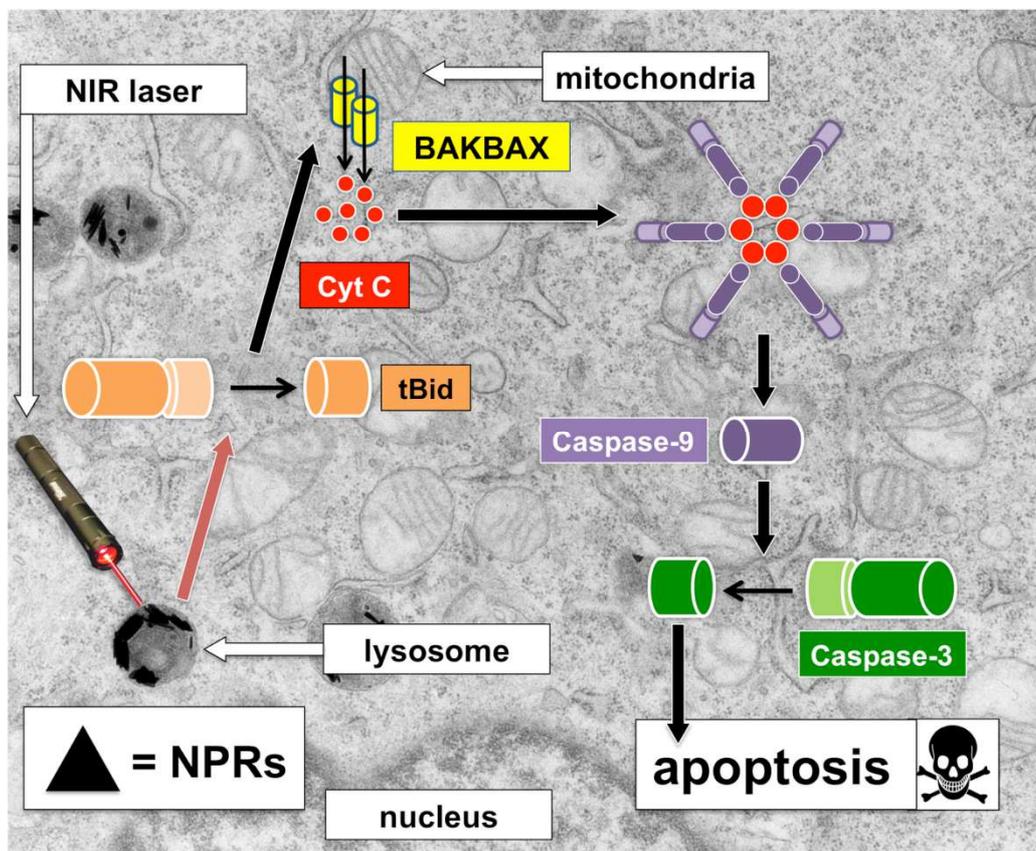


Figura 4.11: Propuesta de mecanismo de apoptosis inducida por PTT utilizando NPR-G. Los AuNPRs se acumulan en los lisosomas y tras la irradiación de 5 W/cm^2 a 1064 nm se liberan, se activa Bid que activa la vía mitocondrial de la apoptosis a través de la activación de Bak y/o Bax que permite la salida de citocromo C de la mitocondria, lo que conlleva a la activación de la caspasa 9 y posteriormente de la caspasa 3 produciendo la muerte de la célula.

Estos datos en conjunto muestran que los AuNPRs se acumulan en los lisosomas que se permeabilizan tras la irradiación, permitiendo la liberación de

los AuNPRs, esto produce la activación de Bid que activa la vía mitocondrial de la apoptosis provocando la muerte de la célula (figura 4.11)

La ruptura de los lisosomas se ha visto que induce apoptosis a través de varios estímulos [373], aunque una excesiva ruptura induce necrosis. Se ha visto que una permeabilización parcial puede ser suficiente para inducir activación de caspasas y permeabilización mitocondrial [374]. La permeabilización de los lisosomas podría llevar a la liberación de moléculas, como por ejemplo las catepsinas que activarían Bid [373-379].

4.2.4 Papel de las catepsinas en el mecanismo de apoptosis inducida por PTT con AuNPRs

Las catepsinas son proteasas que se localizan en los lisosomas capaces de procesar Bid y activarlo. Para que esto ocurra es necesario que se permeabilicen los lisosomas y salgan las catepsinas al citosol, tal y como hemos visto que ocurre (figuras 4.9 y 4.10) [375]. Para confirmar el papel de las catepsinas en el mecanismo de muerte inducido mediante PTT sería necesario la inhibición de las catepsinas. A falta de inhibidores eficaces de las catepsinas se utilizaron células MEF que carecen de las catepsinas B y D (obtenidas de los correspondientes ratones KO). MEF catBwt y MEF catB^{-/-} (células MEF primarias con y sin catepsina B), MEF catDwt y MEF catD^{-/-} (células MEF primarias con y sin catepsina D). Aunque estos resultados son preliminares y no concluyentes, se ha considerado oportuno comentarlos en este apartado.

Se incubaron estas células primarias e irradiaron en las mismas condiciones anteriores (durante 2 y 4 min a 5 W/cm²) y no se observó muerte en ninguna de ellas, incluso aumentando el tiempo de incubación con los NPRs a 24 h y duplicando su concentración (0.2 mg/mL) (figura 4.12), a excepción de las células MEF catD^{-/-}. Se puede observar que las células wt son más resistentes a la estaurosporina, incluso al EtOH que las utilizadas en los apartados anteriores (figura 4.6). Por otro lado las MEF catD^{-/-} son más sensibles que su correspondiente wt, tanto a la irradiación como a la estaurosporina y EtOH.

Estas células son cultivos primarios, a diferencia de los mutantes utilizados anteriormente que estaban inmortalizados con el virus sv40. La primera diferencia al trabajar con células primarias es su bajo metabolismo, lo que se traduce en una reducida entrada de los AuNPRs en el interior de la célula. Incluso con incubaciones de 48 h con NPR-TG se observa muy poca fluorescencia en las células (por microscopía). Por lo que se procedió a inmortalizar las células mediante la transformación espontánea 3T9 (3.1.8), para obtener unas líneas estables y buscar unas condiciones que induzcan una respuesta similar a la observada con las células inmortalizadas mediante el

virus sv40. Para diferenciar estas células se denominan sv40 o 3T9 según el protocolo de inmortalización.

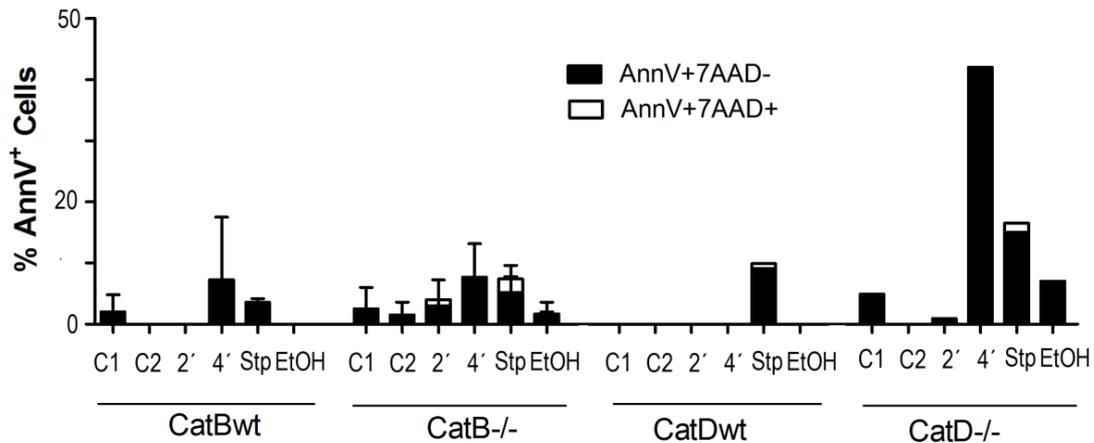


Figura 4.12: Análisis del efecto de la irradiación en la muerte de células MEF primarias. Se incubaron células MEF primarias carentes de las catepsina B (CatB^{-/-}), catepsina D (CatD^{-/-}) y sus correspondientes controles (wt) con 0.2 mg/mL de NPR-G durante 24 h y tras lavar el exceso, se irradiaron con un laser a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² durante 2 o 4 min (2' o 4'). Se analizó la muerte celular por citometría de flujo tras 5 h de la irradiación utilizando las sondas AnnV y 7 AAD como se indica en materiales y métodos. C1: células incubadas con NPR-G sin irradiar. C2: células sin NPR-G irradiadas. Como control de apoptosis se utilizó estaurosporina (stp) y de necrosis etanol (EtOH). En la gráfica se representa la media ± SEM de 2 experimentos independientes para catB y 1 en el caso de catD.

Lo primero que se analizó fue la cinética de entrada de los AuNPRs por citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 4.13 A, vemos que excepto en las células MEF 3T9 catB^{-/-}, en el resto la entrada de NPR-AG es similar y comparable con las células MEF sv40 wt utilizadas anteriormente. Con estos resultados decidimos incubar las células 3T9 wt durante toda la noche con los AuNPRs. Tras esa incubación se irradiaron las células durante 2 y 4 minutos a 5 W/cm² y se midió el incremento de temperatura (figura 4.13 B). Para las células MEF 3T9 catB wt la temperatura no llega a los 50°C pero sí para las MEF 3T9 catD wt. Esta diferencia hace que la muerte para las células MEF 3T9 catB wt solo llegue hasta el 12% mientras que para las MEF 3T9 catD wt se alcance un 50% (similar a las MEF sv40).

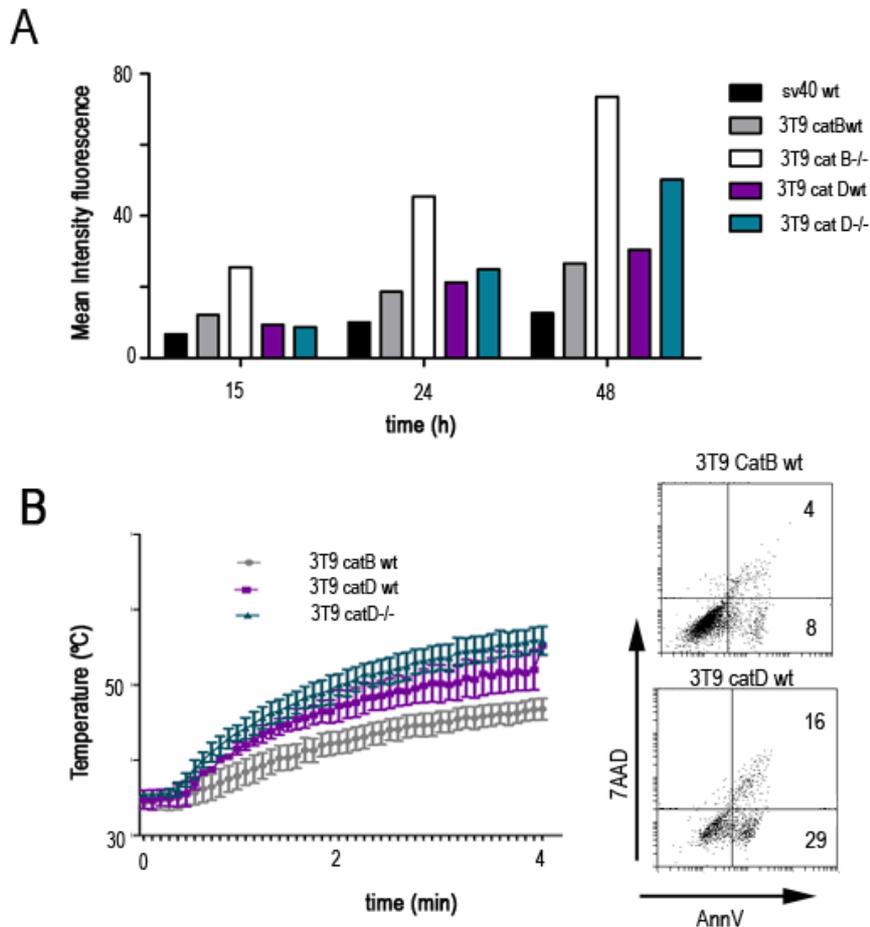


Figura 4.13: Análisis de la internalización de AuNPRs en células carentes de las catepsinas B y D. Se incubaron células MEF 3T9 carentes de la catepsina B (3T9 catB^{-/-}), catepsina D (3T9 catD^{-/-}) y sus correspondientes controles (wt) con 0.1 mg/mL de AuNPRs durante distintos tiempos. Tras lavar el exceso **(A)** se analizó la intensidad media de fluorescencia de NPR-AG, por citometría de flujo tras 15, 24 y 48 h de incubación. **(B)** Se incubaron las células con 0.1 mg/mL NPR-G durante toda la noche y tras lavar el exceso se irradiaron a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² durante 4 minutos, se midió la temperatura del pocillo (izquierda) y se analizó (a la derecha) la muerte celular por citometría de flujo a las 5 h de la irradiación utilizando las sondas AnnV y 7AAD. Los números de los diagramas de puntos indican el porcentaje de células en cada cuadrante, AnnV⁺7AAD⁻ en el inferior y AnnV⁺7AAD⁺ en el superior. En la gráfica se representa la media ± SEM de 3 mediciones independientes.

Estos resultados parecen indicar que debemos optimizar las condiciones para las células MEF 3T9 catB hasta conseguir que la temperatura llegue a los 50°C en el pocillo, se mueran aproximadamente un 50% de las células wt y la entrada de los AuNPRs en las 3T9 catB^{-/-} sea similar a las wt. Sin embargo para las células MEF 3T9 catD parece que éstas pueden ser las condiciones óptimas.

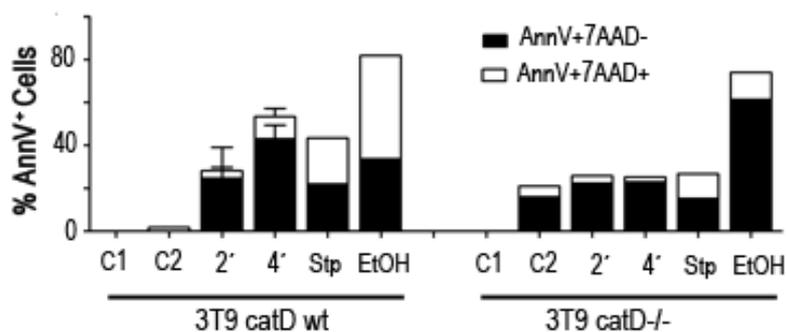


Figura 4.14: Análisis del papel de la catepsina D en la muerte inducida por irradiación de células MEF 3T9 incubadas con AuNPRs. Se incubaron células MEF 3T9 carentes de la catepsina D (3T9 catD^{-/-}) y su control (3T9 catD^{wt}) con 0.1 mg/mL de NPR-G durante toda la noche. Tras lavar el exceso se irradiaron a 1064 nm con una potencia de 5 W/cm² durante 2 o 4 min (2' o 4') y se analizó la muerte celular por citometría de flujo a las 5 h de la irradiación utilizando las sondas AnnV y 7AAD. En la gráfica se representa la media \pm SEM de 2 experimentos independientes en el caso de células MEF3T9 catD^{wt} y 1 para catD^{-/-}. Todo ello como se indica en materiales y métodos. C1: células incubadas con NPR-G sin irradiar. C2: células sin NPR-G irradiadas. Como control de apoptosis se utilizó estaurosporina (stp) y de necrosis etanol (EtOH).

Tanto en las células 3T9 catD^{wt} como en las deficientes en catD, aumenta la temperatura por encima de 50°C, llegando hasta los 55°C (figura 4.13 B) Sin embargo, la muerte de las células 3T9 catD^{-/-} solo llega al 25%, la mitad que para las wt (figura 4.14). Estos resultados preliminares parecen indicar una posible participación al menos de la catepsina D en el mecanismo de muerte celular. Aunque son necesarios más experimentos para poder confirmar el papel de las catepsinas en la muerte celular inducida por PTT.

4.2.5 Discusión

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido la síntesis de NPs altamente eficientes en la producción de calor, que además pueden ser dirigidas al tejido diana, disminuyendo así los efectos secundarios de las terapias convencionales. Los materiales plasmónicos, tienen la capacidad de transformar luz en calor. Este calor se puede utilizar para imagen [5], liberación de drogas [2, 3], biosensores [32] o PTT que resulta en cambios en las células tumorales que conducen a su muerte mediante ablación térmica [1]. Se han diseñado multitud de materiales plasmónicos de diferente composición (oro, plata, cobre, carbono, etc.), estructura (esferas, cilindros, prismas, etc.) y con diferentes recubrimientos (polímeros, carbohidratos, péptidos, etc), que pueden producir calor al excitarse con luz en el NIR. De todos ellos el oro presenta unas propiedades fisico-químicas que le proporcionan gran estabilidad y alta

eficiencia calorífica que junto con la variedad y sencillez de métodos de síntesis, lo hacen uno de los más eficientes generadores de calor [380].

Debido a todo esto, se utilizó la capacidad calorífica de los AuNPRs para inducir muerte celular mediante PTT sobre líneas celulares. Con estas NPs se encontraron unas condiciones óptimas para inducir apoptosis en células MEF, 2-4 min de irradiación a una potencia de 5 W/cm².

La hipertermia es un concepto relativamente antiguo con aplicación en el tratamiento del cáncer, que se basa en la generación de calor localizada en el tumor. Un incremento de temperatura suave (hasta 43°C) sensibiliza a quimioterapia o radioterapia [338]. Sin embargo, incluso calentando desde el interior de la célula, si se hace suavemente, la temperatura no es suficiente para matar a las células [349]. Es necesario aumentar la temperatura en mayor grado para inducir muerte celular [341], lo que respalda los resultados obtenidos (figura 4.4 y 4.13 B) que muestran la necesidad de alcanzar temperaturas por encima de 50°C para inducir la muerte de las células.

La PTT ya se encuentra en fase 1 en ensayos clínicos [1] en el tratamiento de diversos cánceres como cabeza y cuello (NCT00848042) y pulmón (NCT01679470) (para más información; AuroLase® y clinicaltrial.gov). Sin embargo, la mayoría de los trabajos no exploran en detalle el tipo de muerte celular que produce. La necrosis es la respuesta celular más común durante la ablación tumoral vía PTT [18, 34, 365]. Aunque un número limitado de estudios han propuesto la apoptosis como mecanismo de muerte [15-17], la mayoría de estos trabajos no exploran con detalle si la muerte celular es realmente por apoptosis. Determinar el tipo de muerte celular es muy importante porque el modo en que una célula se muere puede tener diferentes consecuencias. La necrosis cursa con ruptura de la membrana plasmática, por lo tanto lleva a la liberación de material intracelular produciendo una respuesta inflamatoria no controlada con consecuencias no deseadas, puede dañar los tejidos adyacentes incluso promover el crecimiento tumoral o favorecer resistencias a tratamientos [19]. En la apoptosis sin embargo, se mantiene la integridad de la membrana, además las células apoptóticas secretan señales "eat-me" para que los macrófagos las encuentren y las fagociten [381]. Por ejemplo, la traslocación de la fosfatidilserina (PS) o la calreticulina de la parte interna de la membrana plasmática a la externa, quedando de esta forma expuesta al reconocimiento por parte de células fagocíticas. La fagocitosis de células muertas es necesaria para evitar reacciones autoinmunes [382]. Ratones deficientes en la maquinaria fagocítica presentan enfermedades autoinmunes como el lupus sistémico eritromatoso (SLE) [383], artritis crónica en adultos o anemia letal en embriones [384, 385]. Aunque la apoptosis también produce una activación del sistema inmune, los mecanismos y consecuencias son diferentes, por ejemplo, la fagocitosis de células apoptóticas normalmente

activa la inmunidad antitumoral por un proceso conocido como "cross-priming" [21]. Además, cuando las células apoptóticas interactúan con macrófagos, se produce la liberación de citoquinas anti-inflamatorias, sin embargo las células necróticas inducen la liberación de citoquinas inflamatorias [172]. Es por todo ello que nos planteamos modular las condiciones para inducir apoptosis mediante PTT utilizando AuNPRs.

Como respuesta a un estímulo externo tanto la apoptosis como la necrosis pueden ocurrir de forma independiente, secuencial o simultánea [22]. Lo que puede depender de la cantidad de NPs internalizadas y la energía absorbida durante la irradiación [11]. En el presente trabajo se ha conseguido determinar la apoptosis como mecanismo de muerte celular inducida por PTT utilizando AuNPRs. Esto se ha demostrado con el estudio de cinética de la muerte celular en el que se observa que las células presentan primero un fenotipo apoptótico que progresa a necrosis secundaria con el paso del tiempo. Estos datos también se apoyan en la activación de la caspasa 3 (figura 4.5) y la protección frente a la muerte de los mutantes carentes de caspasas [386] y proteínas pro-apoptóticas [387] (figura 4.6). La respuesta de las células a la hipertermia depende de la intensidad del estímulo, resultados previos muestran que células incubadas con estos mismos AuNPRs irradiadas con el mismo láser pero a mayor potencia (30 W/cm^2 en lugar de 5 W/cm^2), muestran un fenotipo necrótico inmediatamente después de la irradiación [31]. Por lo tanto, modulando los parámetros de irradiación (potencia y tiempo) es posible conseguir variar el mecanismo de muerte celular, ya que la respuesta de la célula frente al incremento de temperatura depende de cómo se produzca este incremento (suavemente o de forma brusca) además del tiempo que la temperatura se mantenga elevada [367].

El conocimiento del mecanismo de apoptosis es importante ya que las células tumorales adquieren mutaciones que les permiten evadir la apoptosis [388, 389]. Para determinar el mecanismo de apoptosis se utilizaron mutantes de células MEF que carecen de proteínas pro-apoptóticas que intervienen en distintas etapas de la apoptosis. Los resultados obtenidos, indican que la apoptosis se lleva a cabo por la vía mitocondrial (figura 4.6) y que la proteína proapoptótica Bid tiene un papel importante en dicho proceso [81] (figura 4.8). Bid puede ser activado por varias proteasas, como la caspasa 8 que corta Bid tras Asp⁵⁹ [114] activando la vía mitocondrial de la apoptosis [370]. Aunque la activación de Bid no queda clara en este trabajo, se ha descartado la caspasa 8 como activadora de Bid (figura 4.8) al no tener ningún efecto protector el inhibidor de la caspasa 8 IETD.

Además de la mitocondria, se ha observado que otros orgánulos como los lisosomas o el retículo endoplásmico (ER) están también relacionados con la muerte celular [390]. Los lisosomas son orgánulos acidificados que juegan un

papel importante en el reciclado de proteínas intracelulares por lo que contienen un amplio espectro de enzimas hidrolíticas, entre las cuales se encuentran las catepsinas.

Nuestros resultados muestran acumulación de los AuNPRs en los lisosomas que se liberan tras la irradiación (figuras 4.9 y 4.10) de forma progresiva. Se ha observado que la ruptura de los lisosomas participa en la apoptosis inducida por varios estímulos [373], aunque una excesiva ruptura induce necrosis [391]. Un trabajo previo ha mostrado que es posible modular la permeabilización de los lisosomas, sin que afecte a la viabilidad celular [365]. Otro trabajo muestra que una permeabilización parcial puede ser suficiente para inducir activación de caspasas y permeabilización mitocondrial [374]. La permeabilización de los lisosomas podría llevar a la liberación de moléculas, como por ejemplo las catepsinas que activarían Bid [373-379]. Las catepsinas son proteasas que se localizan en los lisosomas cuyo papel principal fue considerado la degradación de proteínas, aunque recientemente se ha visto que también intervienen en la apoptosis [392]. Las catepsinas son capaces de procesar Bid y activarlo, aunque también tienen como sustrato otras proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-x_L o Mcl-1, así como XIAP [393], para lo que es necesario que se liberen de los lisosomas [375].

Para indagar un poco más en el tema, se utilizaron mutantes de catepsinas D y B [376]. Aunque estos resultados son preliminares y no permiten sacar conclusiones, parecen indicar una posible participación al menos de la catepsina D en la muerte inducida por PTT con AuNPRs (figura 4.13). Para confirmar este papel habría que analizar si la ausencia de catepsina D afecta al procesamiento de Bid y a la activación de las caspasas. Además, existen otras proteínas lisosomales, como la quimiotripsina B, una serín-proteasa que también es capaz de procesar Bid a pH neutro [394] que aunque es una enzima digestiva secretada por el páncreas, se encuentra también en los lisosomas de algunas células. Esta proteína actuaría sobre Bid, de la misma forma que las catepsinas, tras la permeabilización del lisosoma. Aunque se ha observado que la quimiotripsina B es más efectiva en el procesamiento de Bid en extractos celulares a pH neutro que las catepsinas B y D [395].

En el presente trabajo hemos determinado la apoptosis como tipo de muerte celular desencadenada por PTT utilizando AuNPRs, más concretamente vía mitocondrial, en la cual ejerce un papel principal la proteína pro-apoptótica Bid. Esta activación se produciría a través de la catepsina D liberada de los lisosomas, si bien este resultado está pendiente de confirmación.

4.3 Toxicidad *in vitro*

El gran desarrollo de la nanotecnología ha abierto un debate sobre la seguridad de los nanomateriales y el impacto medioambiental que presentan. Por ello hay numerosos trabajos que estudian la toxicidad de la gran variedad de nanopartículas que se van sintetizando. Algunos no han encontrado efecto tóxico [396], mientras que otros sí que han visto toxicidad ya sea porque provocan la muerte de la célula o porque alteran su función [13].

La toxicidad de las NPs inorgánicas es un tema complicado debido a la gran variedad de estudios que se pueden encontrar en la bibliografía. Los problemas que encontramos son los siguientes:

- Diferentes tipos de nanopartículas en cuanto a composición, tamaño, cubierta, propiedades fisicoquímicas, etc.
- Tipo de células usadas (primarias o transformadas) para determinar la toxicidad.
- Tipo de ensayo de toxicidad: MTT, LDH, generación de ROS, calceína, anexina-V, genotoxicidad, cambios morfológicos, etc.
- Rango de concentraciones. Además de utilizar diferentes concentraciones las unidades en las que se muestran los datos en cada estudio son diferentes y en realidad la toxicidad depende del área de superficie [397].
- Tiempos de incubación

Debido a estas variaciones es muy difícil comparar entre distintos estudios y no se ha conseguido aún llegar a un acuerdo en cuál es la mejor manera de estudiar la toxicidad de las NPs, aunque todos coinciden en que es necesario el establecimiento de unos principios y unos protocolos que permitan la manipulación y el uso de nanomateriales de forma segura. [28]

Así, nos propusimos llevar a cabo un estudio exhaustivo del efecto de los AuNPRs utilizando varias líneas celulares primarias y transformadas tanto humanas como de ratón. Para ello se analizaron diversos aspectos como la generación de ROS, caída de potencial mitocondrial, apoptosis y la capacidad para generar colonias. Así mismo se utilizó un amplio rango de concentraciones desde 25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los experimentos consistieron en incubar las líneas celulares y las células primarias que aparecen en la tabla 4.1 con cuatro tipos de nanoprismas; NPR, NPR-T, NPR-G y NPR-TG a las concentraciones 0, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se detalla en el apartado 3.5 de materiales y métodos. Tras 24 o 48 h de

la incubación se analizaron distintos parámetros para determinar la toxicidad y el efecto del recubrimiento de dichos AuNPRs.

Humanas	Líneas celulares	A549	Carcinoma de pulmón
		MiaPaca	Carcinoma de páncreas
		HeLa	Carcinoma de cervix
	primarias	PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
Murinas	Líneas celulares	MEF	Fibroblastos embrionarios
		B16	Melanoma
		MC57G	Fibrosarcoma
	primarias	Macrófagos	Macrófagos diferenciados de médula ósea

Tabla 4.1: Células utilizadas en el estudio de toxicidad *in vitro*.

4.3.1 Internalización de los nanoprismas en la célula

Lo primero que estudiamos fue la internalización de los AuNPRs en las células. Para ello se incubaron las distintas líneas celulares (tabla 4.1) con 0, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPR-T y NPR-TG durante toda la noche. Tras lo cual se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia como se explica en materiales y métodos (apartado 3.15). Las fotografías fueron tomadas con la misma intensidad de láser. El tratamiento de imagen para los retoques mínimos de eliminación de ruido de fondo ha sido el mismo para todas las líneas. De este modo las imágenes son comparables.

En estas condiciones, como se observa en la figura 4.15, todas las líneas celulares internalizan los AuNPRs. La internalización de los NPR-TG es mayor que la de los NPR-T a pesar de que la concentración es la mitad, por lo que la glucosa favorece la internalización de los AuNPRs, aunque el nivel de internalización depende de la línea celular. Si comparamos el aumento en la internalización debido a la glucosa entre las distintas líneas, podemos observar que hay algunas células como MiaPaca, HeLa, A549 y B16 en las que la glucosa tiene mayor importancia en la entrada de los AuNPRs que en las MC57G que aunque vemos aumento de internalización con la glucosa, sin ésta las células ya captan bastantes AuNPRs.

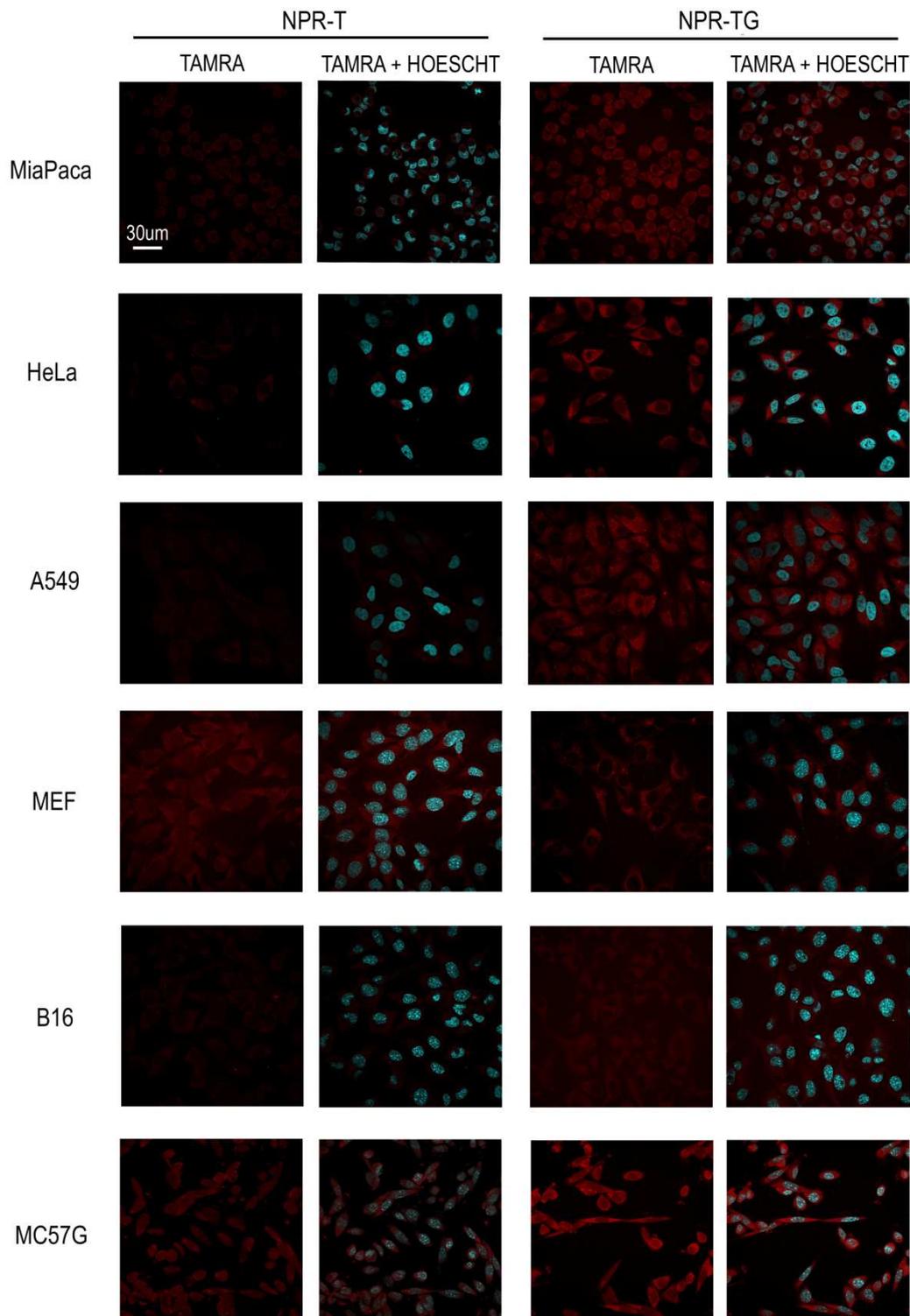


Figura 4.15: Análisis de la internalización de los nanoprismas en diferentes líneas celulares. Se incubaron 6 líneas celulares humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-T o con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-TG durante toda la noche. Tras lavar el exceso, las células fueron fijadas con PFA 4%, se tiñeron con Hoechst 3342 (DNA) y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal como se indica en materiales y métodos. Todas las fotografías están tomadas con los mismos parámetros. Escala 30 μm .

Además podemos observar que la glucosa tiene poco efecto en las células MEF, donde la internalización ya ocurre sin glucosa. Ésta línea es la única que no es tumoral, son fibroblastos inmortalizados con el virus sv40. Este hecho apoya la idea que se ha propuesto de usar la glucosa como ligando para favorecer la internalización y selectividad por parte de las células tumorales, ya que éstas presentan un metabolismo más dependiente de la glicólisis [398].

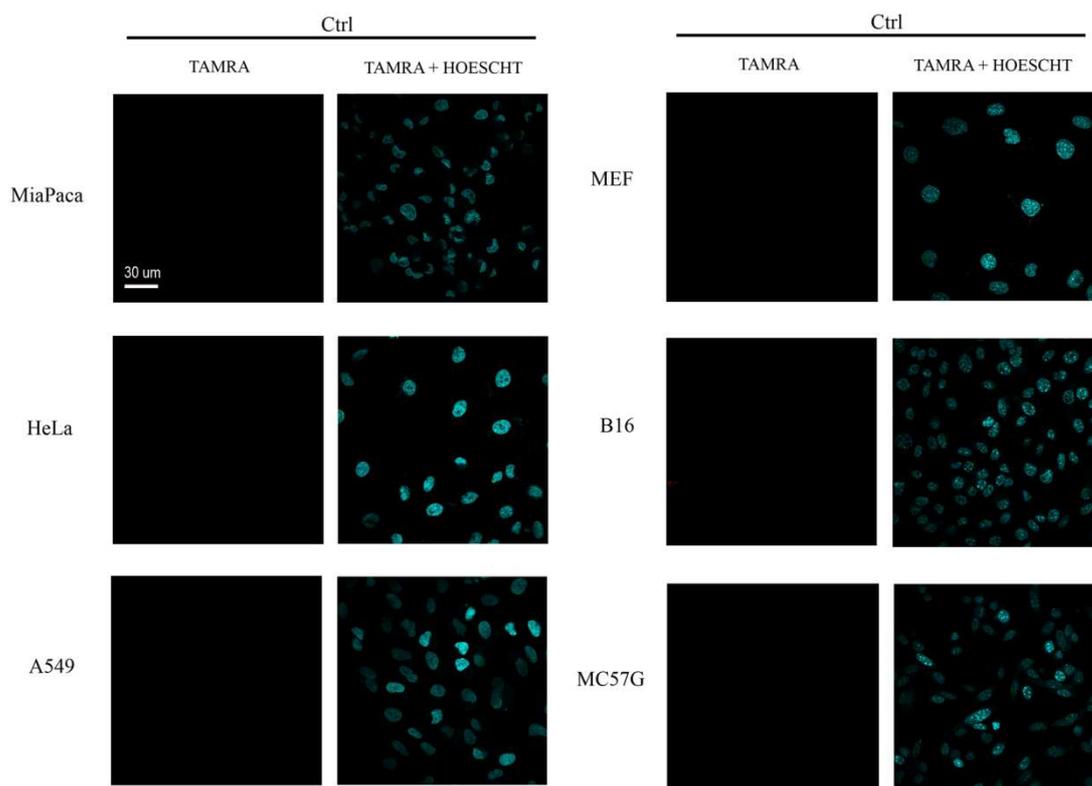


Figura 4.16: Controles de la internalización de los nanoprismas en las distintas líneas celulares. Líneas celulares humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) sin nanopartículas se fijaron con PFA 4%, se tiñeron con Hoechst 3342 (DNA) y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal, como se indica en materiales y métodos. Las fotografías están tomadas en las mismas condiciones que en la figura 4.15. Escala 30 μm.

En la figura 4.16 podemos ver que estas diferencias no se deben a una autofluorescencia de las células, ya que las células control (que no han sido incubadas con AuNPRs) no presentan fluorescencia a la longitud de onda de emisión del TAMRA.

Así vemos que aunque la internalización de los AuNPRs depende del tipo celular, debido a la diferencia de las propiedades endocíticas de cada línea, se observa claramente la protección del PEG. Además, el recubrimiento con PEG y glucosa favorece la selectividad e internalización de los AuNPRs por las células diana de acuerdo a resultados previos [24].

4.3.2 Cambios en la morfología celular

Como ya se explicó en la introducción uno de los aspectos por los que las NPs pueden presentar toxicidad es la interacción con proteínas del citoesqueleto [328]. Para analizar cambios morfológicos debidos a la internalización de los nanoprismas se incubaron durante toda la noche las células con los distintos tipos de AuNPRs a concentraciones de 0, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo la granulosidad y complejidad intracelular (SSC) y el tamaño (FSH).

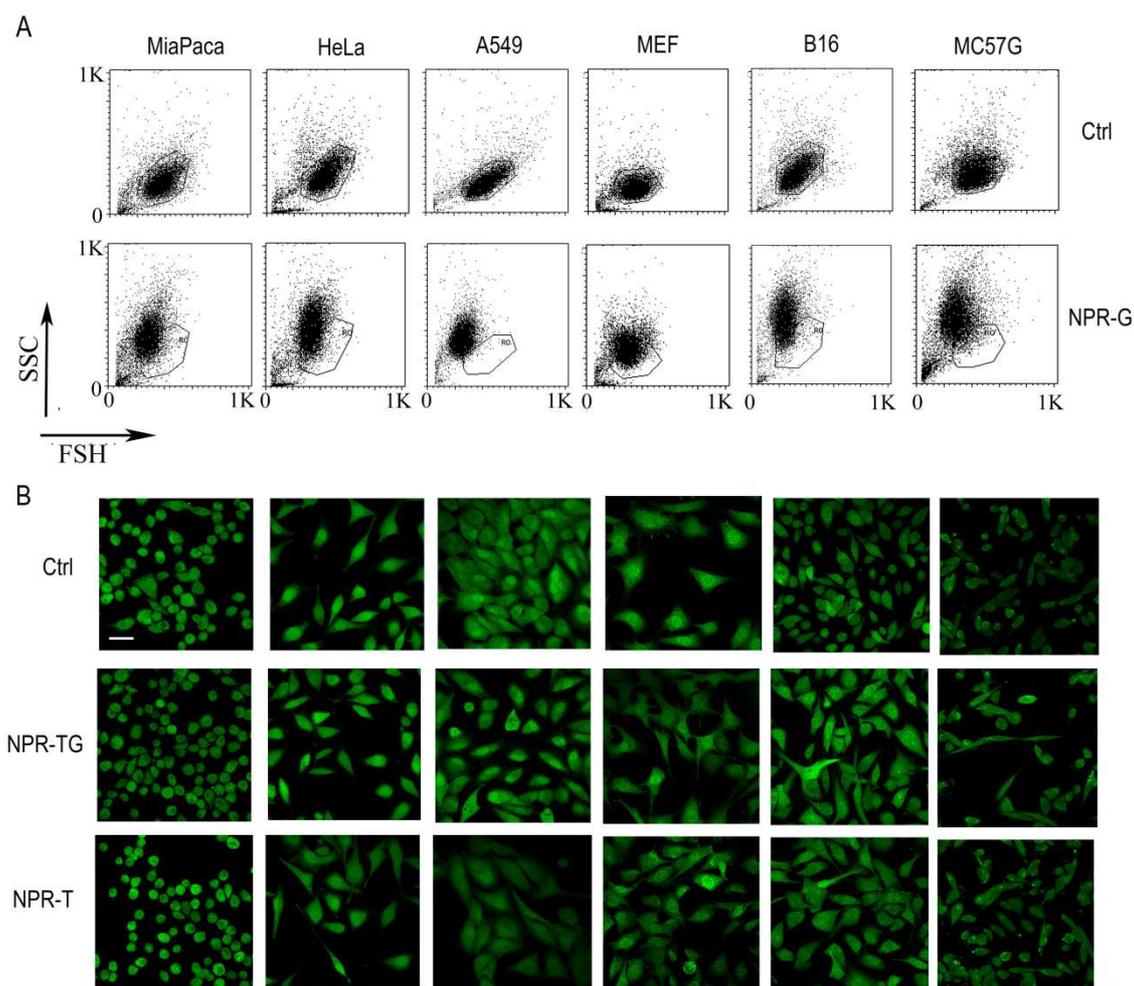


Fig 4.17: Análisis de los cambios morfológicos en la célula tras la internalización de AuNPRs. Se incubaron 6 líneas celulares, humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con 4 tipos de AuNPRs (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) a concentraciones crecientes entre 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 h. Tras lavar el exceso **(A)** se analizó por citometría de flujo el tamaño (FSH) y la complejidad (SSC) de las células. Se muestra un diagrama de puntos representativo para 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPR-G. **(B)** Se fijaron las células con PFA 4%, se tiñó la actina con faloidina y se analizó por microscopía de fluorescencia confocal. Se muestra una fotografía representativa para las células incubadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-TG y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-T. Todo ello como se indica en materiales y métodos. Ctrl: células sin nanoprismas. Escala 30 μm .

En la figura 4.17 A, se puede ver de forma representativa para 100 $\mu\text{g/mL}$ de NPR-G como las células se hacen más pequeñas y aumenta su granulosidad y complejidad intracelular de modo directamente proporcional a la internalización de AuNPRs (figura 4.15). Estos resultados están de acuerdo con los de microscopía de fluorescencia (figura 4.17 B) en los que se analizó la actina mediante tinción con faloidina como viene detallado en materiales y métodos (apartado 3.15). Se puede observar que las células se redondean ligeramente, sin embargo el aumento en SSC es mayor que el cambio observado en la actina, por lo que parece indicar que el mayor cambio que se produce en la célula es el aumento de complejidad, que puede deberse a una mayor granulosidad.

4.3.3 Generación de radicales libres de oxígeno (ROS)

Uno de los mecanismos que más frecuentemente ha sido sugerido como indicador de toxicidad de las NPs es la generación de ROS y el estrés oxidativo. Para analizar la generación de ROS se incubaron durante 48 h las líneas celulares con NPR y NPR-G a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. El marcaje se realizó con 2-hidroxi-etidio (2HE) (ya que detecta el anión superóxido que es el primero y más abundante radical de oxígeno que se genera) y se analizó por citometría de flujo (ver apartado 3.11.3). Como control positivo se utilizó estaurosporina a 0,5 μM . Cabe destacar que en este estudio no se utilizaron las AuNPRs con TAMRA debido a que la longitud de onda de excitación del láser del citómetro corresponde con un mínimo en el espectro de absorción del TAMRA, lo que genera una emisión residual en el rango del 2HE.

Como se observa en la figura 4.18 se produce un ligero incremento de ROS (20%) en todas las líneas celulares, aunque solamente en el caso de las células MEF es estadísticamente significativo. Se observa claramente la dependencia en la generación de ROS con la concentración de AuNPRs, aunque el nivel varía según la línea celular. Además la estaurosporina (control +) genera ROS en todas las líneas pero a diferentes niveles. Esto confirma la importancia que tiene seleccionar una línea u otra para el estudio, ya que los resultados van a ser diferentes.

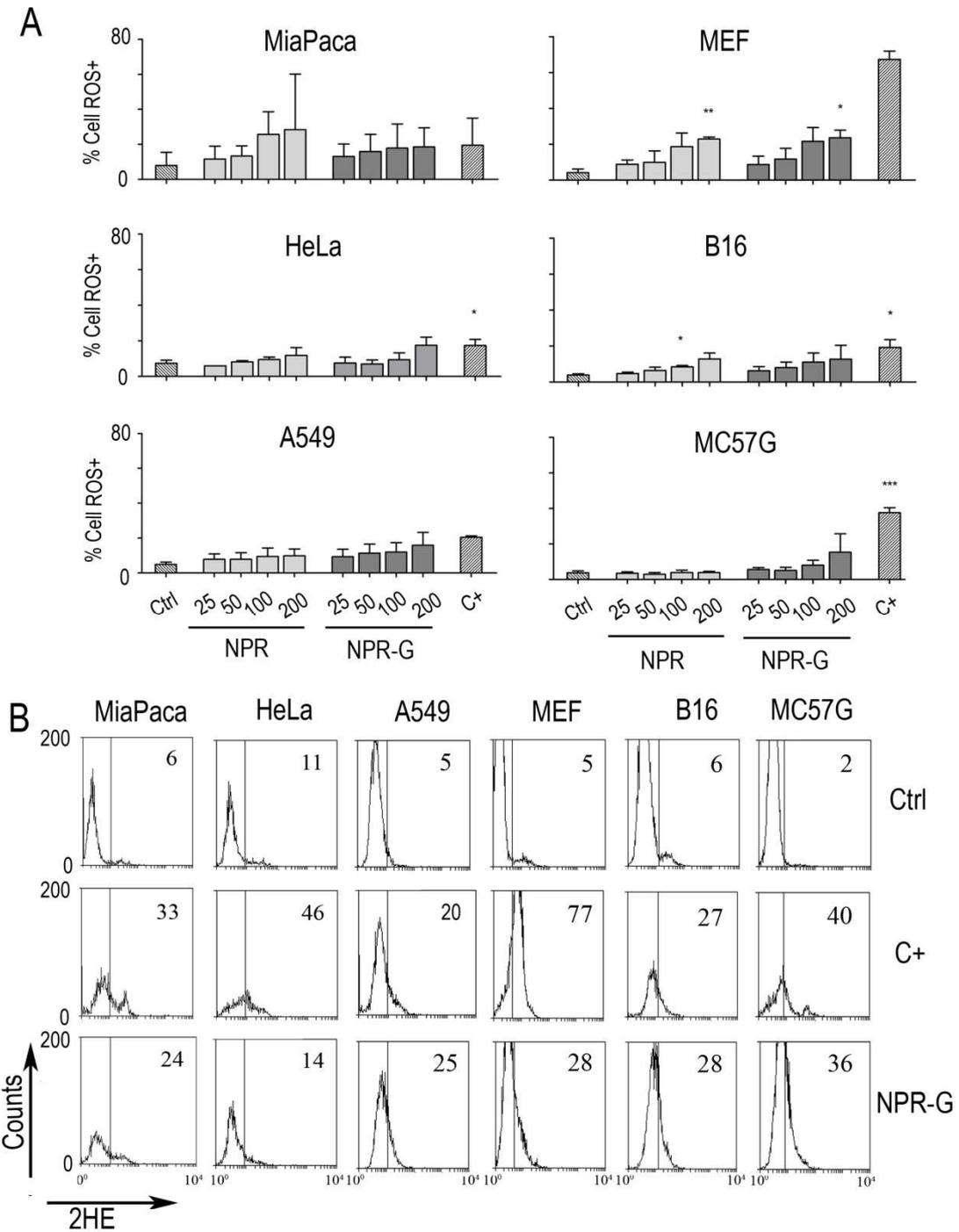


Figura 4.18: Análisis de la generación de ROS en distintas líneas celulares al incubarlas con AuNPRs. Se incubaron 6 líneas celulares, humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con dos tipos de nanoprismas (NPR y NPR-G) a concentraciones crecientes entre 25 y 200 µg/mL y se analizó la generación de ROS con la sonda 2HE por citometría de flujo a las 48 h como se indica en materiales y métodos. **(A)** Representación de la media ± SEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Experimento representativo para NPR-G 100 µg/mL. Los números corresponden al porcentaje de células que producen ROS. Ctrl: células sin AuNPRs. C+: 0.5 µM estaurosporina. Estadística mediante análisis t-student * p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

4.3.4 Caída de Potencial mitocondrial

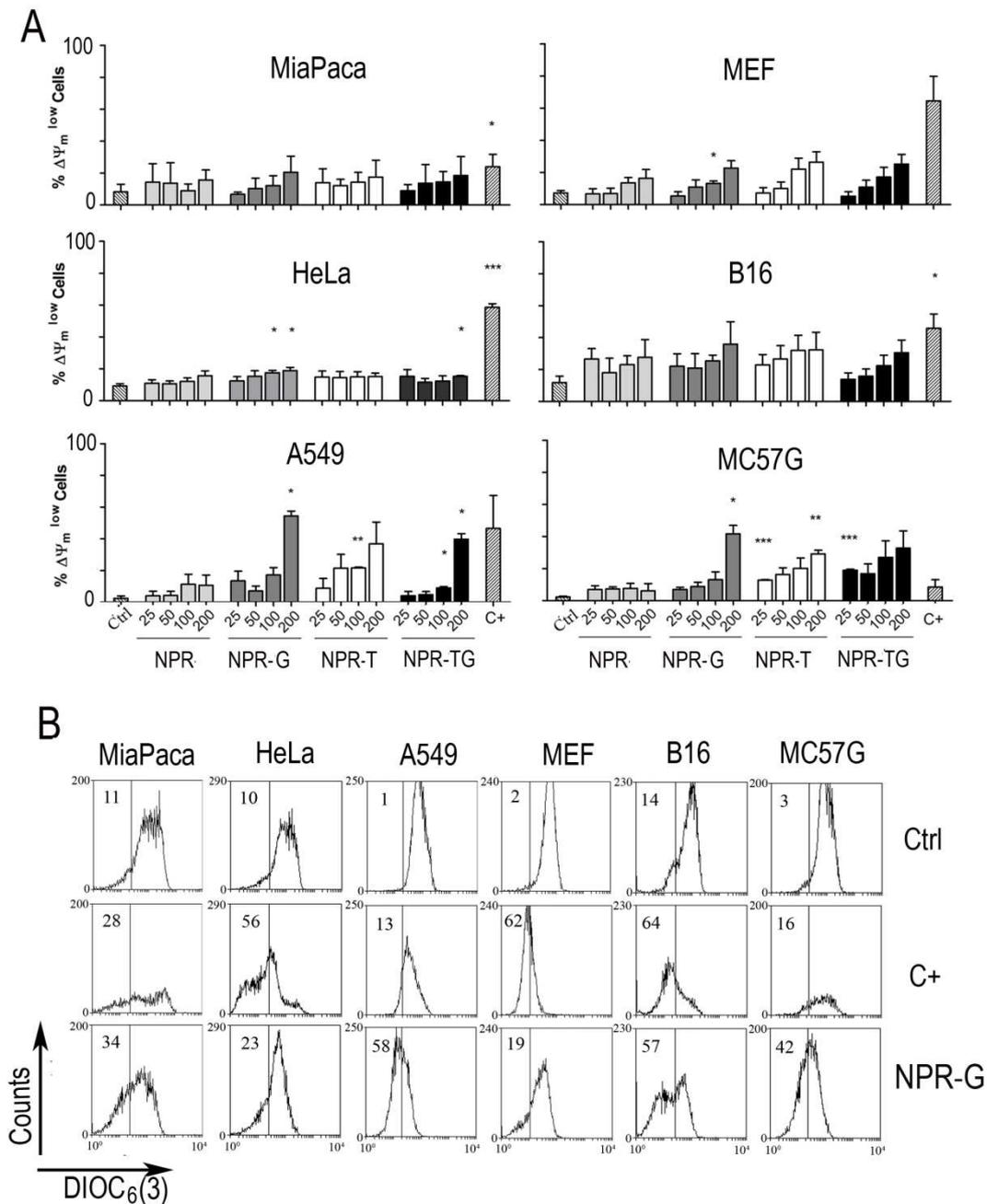


Figura 4.19: Análisis del efecto de los AuNPRs sobre el potencial mitocondrial en distintas líneas celulares. Se incubaron 6 líneas celulares, humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con cuatro tipos de nanoprismas (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) a concentraciones crecientes entre 25 y 200 $\mu\text{g/mL}$ y se analizó la caída de potencial mitocondrial por citometría de flujo con la sonda DIOC₆(3) a las 48h como se indica en materiales y métodos. **(A)** Representación de la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Experimento representativo para NPR-G 100 $\mu\text{g/mL}$. Los números corresponden al porcentaje de células con caída $\Delta\Psi_m$. Ctrl: células sin AuNPRs. C+: estaurosporina 0.5 μM . Estadística mediante t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

La mitocondria es la principal fuente de ROS, lo que puede ocurrir como consecuencia de la depolarización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Por lo que se analizó el estado de la mitocondria.

Para determinar el posible daño mitocondrial se incubaron durante 48 h las líneas celulares con los cuatro tipos de nanoprismas a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Se analizó la caída de $\Delta\Psi_m$ por citometría de flujo con DIOC₆(3), una sonda que se acumula dentro de la mitocondria debido a la diferencia de potencial y cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial externa la sonda sale y se pierde la fluorescencia (ver apartado 3.11.2). Como control positivo se utilizó estaurosporina a 0,5 μM .

Como se puede ver en la figura 4.19, aunque hay diferencias entre líneas y la estadística no es significativa debido a la varianza de los resultados, la concentración y el efecto de la funcionalización de los nanoprismas es evidente. Es decir, la permeabilización de la membrana mitocondrial se produce sobre todo en el caso de los nanoprismas que presentan glucosa (NPR-G y NPR-TG) que como hemos visto anteriormente son los que más se internalizan. Esta caída es más significativa en el caso de las A549 y las MC57G. Igual que ocurría en el caso de la generación de ROS, diferentes líneas, responden de manera diferente.

4.3.5 Muerte Celular

Los resultados vistos hasta ahora parecen indicar que los AuNPRs tienen algún efecto sobre las líneas celulares que podría estar relacionado con una posible toxicidad celular. Por ello decidimos analizar si la viabilidad de las células se veía afectada por la incubación con los AuNPRs, es decir, si los AuNPRs inducen muerte celular.

Para ello se incubaron las líneas celulares con los 4 tipos de AuNPRs a concentraciones entre 25 y 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Se analizó la muerte celular por citometría de flujo, utilizando anexina-V (AnnV) como marcador de apoptosis y 7AAD como marcador de necrosis (como se explica en materiales y métodos 3.11.1).

Según la figura 4.20 en ningún caso se observa muerte celular. Por lo que la caída de $\Delta\Psi_m$ que observamos parece no ser suficiente para la salida de factores apoptogénicos de la mitocondria.

Resultados y Discusión

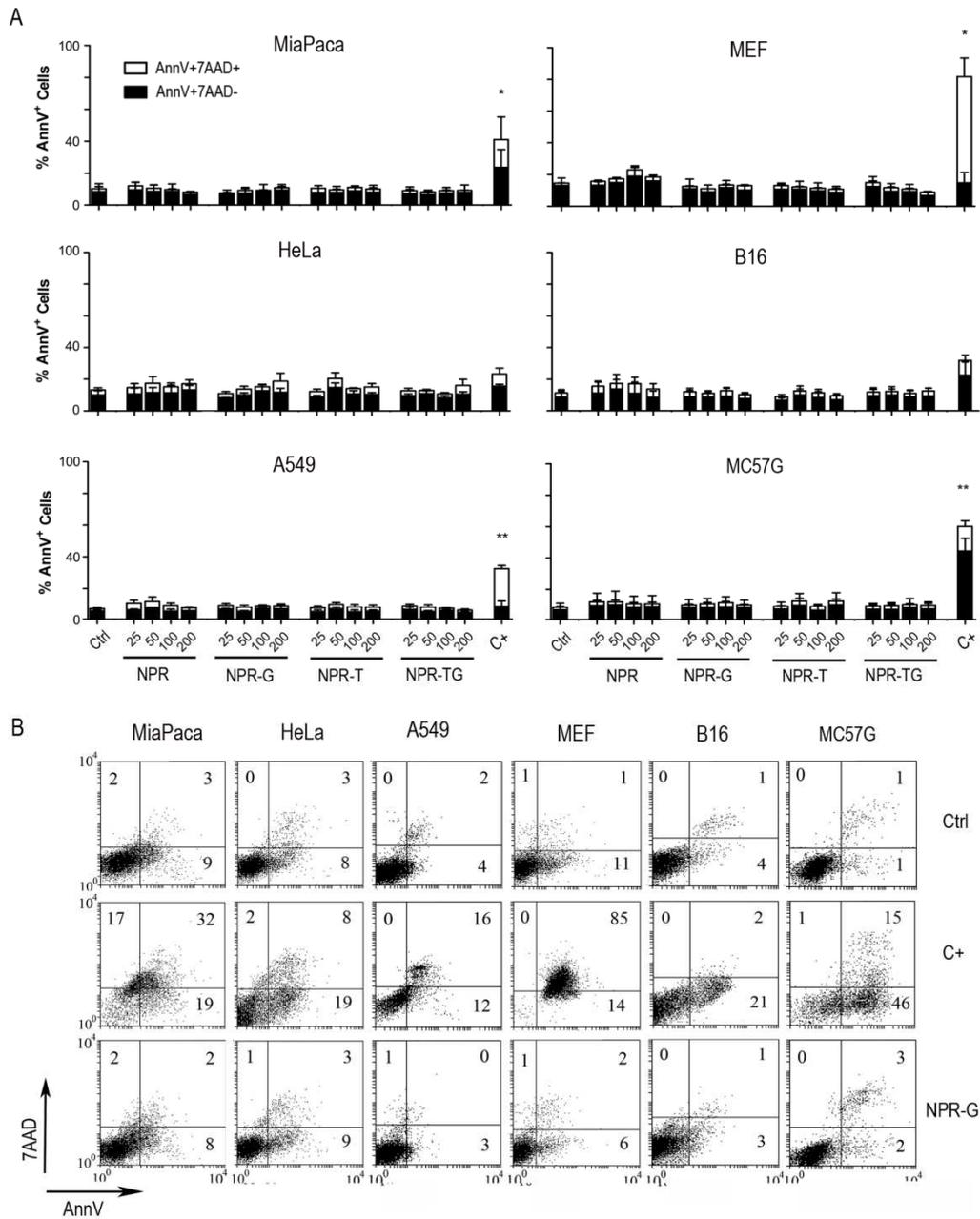


Figura 4.20: Análisis de la muerte celular en distintas líneas al incubarlas con AuNPRs. Se incubaron 6 líneas celulares, humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con cuatro tipos de nanoprismas (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) a concentraciones crecientes entre 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizó la muerte celular a las 48 h por citometría de flujo con la sonda AnnV y 7AAD como se explica en materiales y métodos. **(A)** Representación gráfica de la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Experimento representativo en el que se muestran los controles y la incubación con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NPR-G. Los números corresponden con el porcentaje de células en cada cuadrante. Abajo las células $\text{AnnV}^+\text{7AAD}^-$ y arriba las células $\text{AnnV}^+\text{7AAD}^+$. Ctrl: células sin nanoprismas. C+: estaurosporina 0.5 μM . Análisis estadístico mediante t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

4.3.6 Ensayo clonogénico

Hemos observado caída de potencial mitocondrial que no se correlaciona con muerte celular. Esto puede ser debido a que las células en el momento de analizarlas no estén muertas, pero acaben muriendo más tarde. También puede suceder que la caída de potencial mitocondrial no provoque la salida de factores apoptogénicos y las células sigan vivas tiempo después. Para estudiar si los AuNPRs afectan o no a la viabilidad celular se realizó un ensayo clonogénico que consiste en sembrar 100 células por pocillo (placa de 6 pocillos) y dejar que crezcan colonias. Si las células están vivas y son viables cada célula formará una colonia.

Se incubaron las líneas celulares con los 4 tipos de AuNPRs a concentraciones de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, tras 48 h se tripsinizaron y sembraron 100 cél/pocillo como se explica en materiales y métodos (apartado 3.12). A los 15-21 días se contó el número de colonias formadas. Los datos están expresados en porcentaje referido al control, 100% corresponde a las colonias formadas en el control.

Como se observa en la figura 4.21 las células incubadas con AuNPRs forman el mismo número de colonias que los controles, lo que quiere decir que las células que vemos vivas tras 48 h de incubación con los AuNPRs, continúan estándolo 3 semanas más tarde. Las diferencias que se observan en el caso de las células MiaPaca y HeLa puede deberse a la forma de sus colonias (como se ve en la figura 4.21 B), las células HeLa forman muy pocas colonias, por lo que contar una más una menos se traduce en una gran diferencia porcentual. Y en el caso de las células MiaPaca las colonias no se adhieren bien a la placa, por lo que en el proceso de teñido es posible que se suelten, por eso se observan esas diferencias en la gráfica que no sigue ninguna tendencia. Este ensayo no ha podido llevarse a cabo para las células MC57G porque no forman colonias.

Estas células además de estar vivas tienen la capacidad de duplicarse, por lo que no hay parada de ciclo y los AuNPRs no afectan a su viabilidad. El único caso en el que vemos una tendencia a formar menos colonias con concentraciones crecientes de NPR-G es en las células MiaPaca y aún así el % es menos del 20% a la concentración máxima. Otra vez se manifiesta la importancia en la elección de la línea celular.

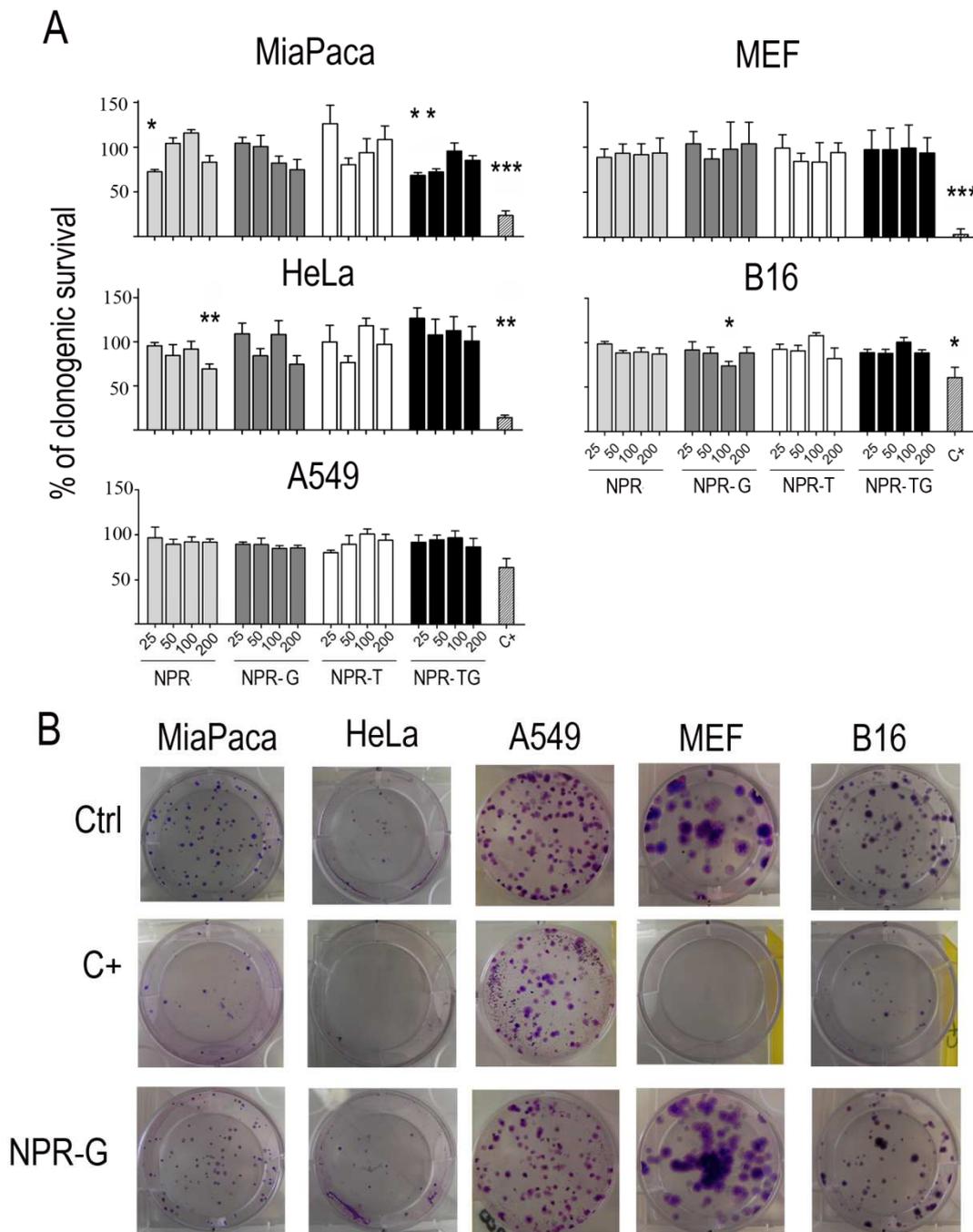


Figura 4.21: Análisis del efecto de los AuNPRs sobre la capacidad de formar colonias de distintas líneas celulares. Se incubaron 6 líneas celulares, humanas (MiaPaca, HeLa y A549) y de ratón (MEF, B16 y A549) con cuatro tipos de nanoprismas (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) a concentraciones crecientes entre 25 y 200 $\mu\text{g/mL}$ y tras 48 h se sembraron las células para un ensayo clonogénico como se indica en materiales y métodos. Las colonias se contaron aproximadamente a los 15 días. **(A)** Porcentaje de formación de colonias respecto al control. Representación de la media \pm SEM de tres experimentos independientes con triplicados cada uno. **(B)** Fotografías de un experimento representativo en el que se muestran los controles y la incubación con 100 $\mu\text{g/mL}$ NPR-G. Ctrl: células sin nanoprismas. C+: estaurosporina 0.5 μM . Estadística mediante el análisis t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

4.3.7 Toxicidad en células primarias

En las líneas celulares hemos visto caída de potencial mitocondrial y generación de ROS a niveles bajos tras 48 h que no va acompañada de muerte celular y además las células mantienen su capacidad de formar colonias. Pero esto no significa que los nanoprismas no sean tóxicos en el contexto fisiológico con células "sanas".

El siguiente paso fue analizar estos mismos parámetros en células primarias. Para ello elegimos células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) como células primarias humanas (apartado 3.3) y macrófagos diferenciados de la médula ósea de ratón (apartado 3.2). Estas células son las primeras que entran en contacto con las NPs y además son células del sistema inmune que intervienen en la eliminación de tumores y células infectadas [399]. Por lo que es importante analizar la toxicidad en este tipo de células.

En estos experimentos se procedió de la misma manera que en el caso de las líneas celulares, a diferencia del tiempo de incubación con los AuNPRs, que fue solamente de 24 h, ya que a las 48 h la muerte basal es demasiado elevada (como viene detallado en el apartado 3.5).

En las PBMCs se observa (fig 4.22 A) menos fluorescencia dentro de las células que con las líneas celulares (fig 4.13), aunque se sigue observando una clara internalización de los AuNPRs dentro de las células.

En cuanto a la caída de potencial mitocondrial no se observan diferencias estadísticamente significativas ni con la concentración ni con los tipos de AuNPRs (fig 4.22 B) aunque sí que se observa un aumento en la caída $\Delta\Psi_m$ en el caso de los NPR-G a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo este dato por sí solo no significa nada, debido a la variedad de tipos de células que estamos analizando (linfocitos, NKs, monocitos, etc.) que presentan un amplio rango de potencial mitocondrial, por lo que pequeñas variaciones en la composición de esta mezcla de células hace que cambie la medida de $\Delta\Psi_m$.

Según la figura 4.22 C parece que se generan ROS a la concentración más alta. Sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo debido a la variabilidad que presentan los diferentes experimentos.

La caída de $\Delta\Psi_m$ y generación de ROS se ven menos afectadas que en el caso de las líneas celulares, lo que puede ser debido a la menor internalización. Como cabía esperar, al igual que para las líneas celulares, no se observa muerte celular (figura 4.22 D), lo que indica que AuNPRs no son tóxicos para las PBMCs.

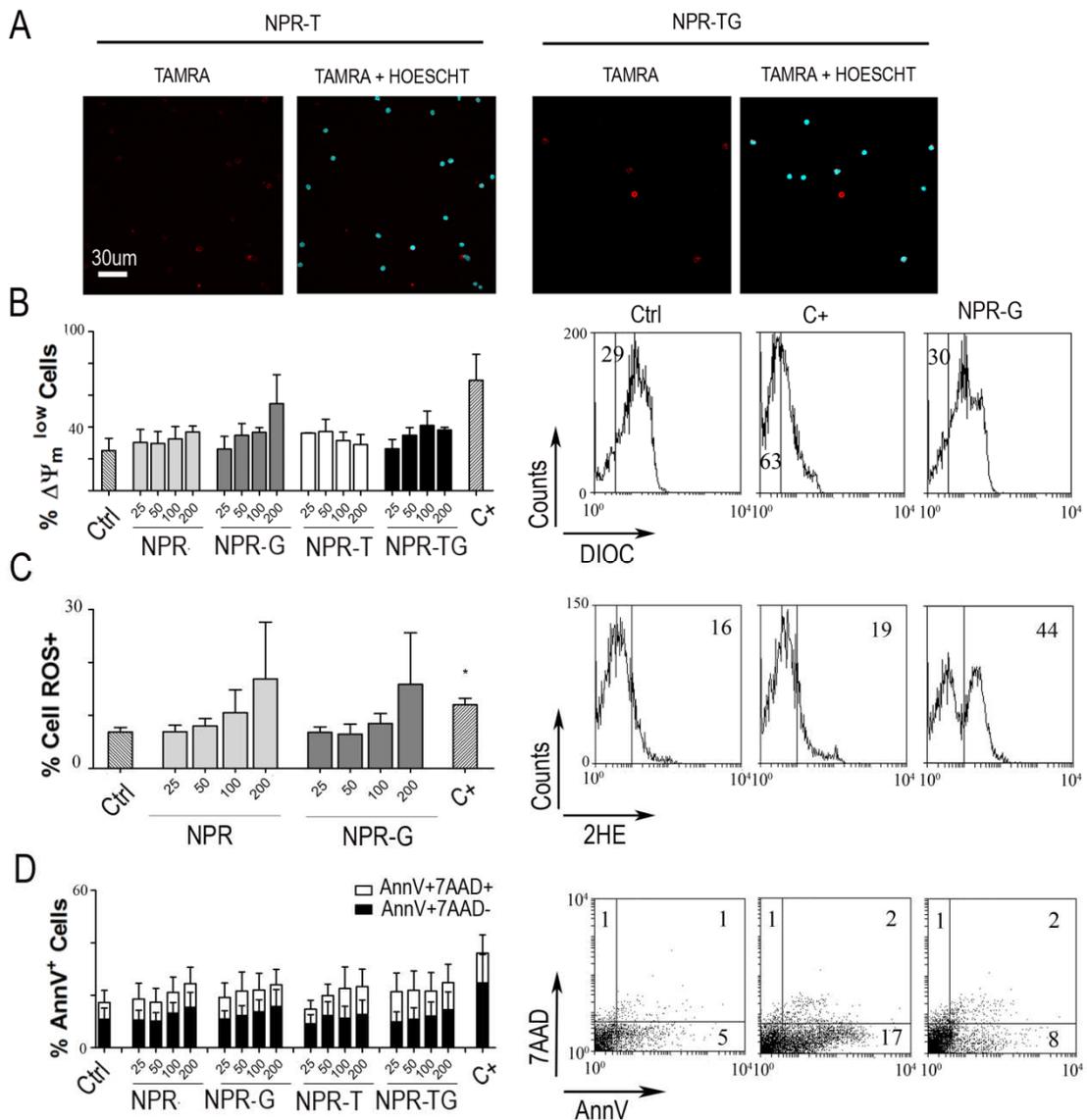


Figura 4.22: Estudio de la toxicidad de AuNPRs sobre PBMCs. Se incubaron PBMCs con cuatro tipos de AuNPRs (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) durante 24 h y se analizaron distintos parámetros. **(A) Internalización de los AuNPRs.** Tras las 24 h de incubación, se lavó el exceso de AuNPRs, se fijaron las células con PFA 4%, se tiñieron con Hoesch 3342 (DNA) y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal. Se muestra un experimento representativo para 100 µg/mL de NPR-TG y 200 µg/mL de NPR-T. Las fotografías están tomadas con los mismos parámetros. **(B) Análisis de la caída $\Delta\Psi_m$** mediante citometría de flujo con la sonda DIOC₆(3). **(C) Generación de ROS** mediante citometría de flujo con la sonda 2HE. **(D) Muerte celular** por citometría de flujo utilizando las sondas AnnV y 7AAD. En las gráficas se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. En los histogramas y diagrama de puntos se muestra un experimento representativo con los controles y 100 µg/mL NPR-G. Los números corresponden con el porcentaje de células con caída $\Delta\Psi_m$, generación de ROS y células AnnV⁺7AAD⁻ (abajo) y AnnV⁺7AAD⁺ (arriba-dcha). Ctrl: células sin nanoprismas. C+: cladribina 5 µM. Estadística mediante el análisis t-student * p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

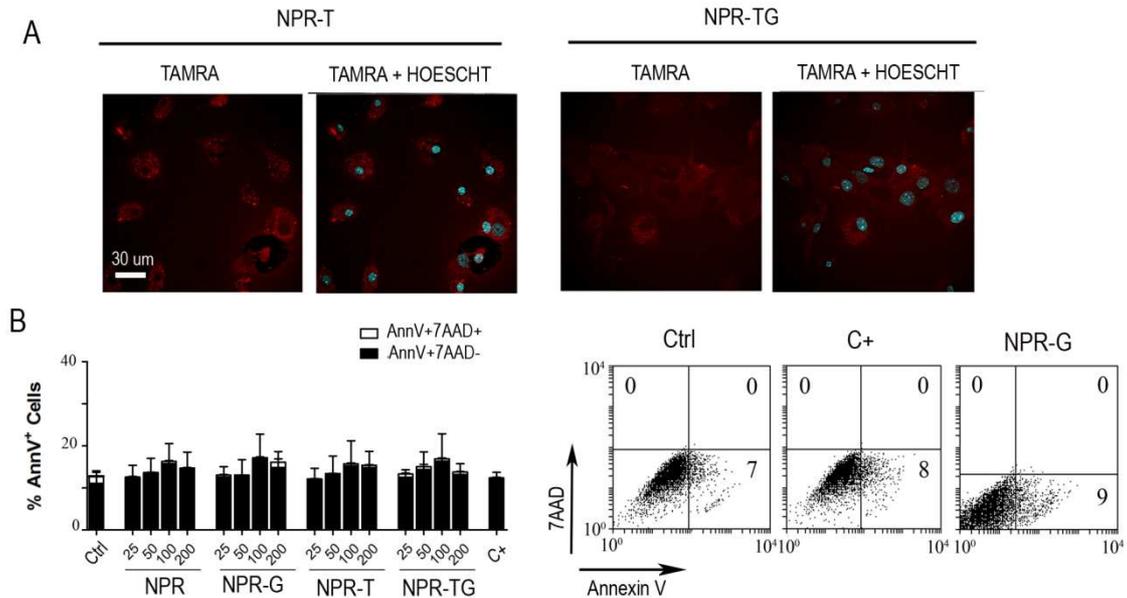


Figura 4.23: Estudio de la toxicidad de AuNPRs en macrófagos. Se incubaron macrófagos diferenciados de ratón con cuatro tipos de nanoprismas (NPR, NPR-G, NPR-T y NPR-TG) durante 24 h y se analizaron distintos parámetros como viene detallado en materiales y métodos. **(A) Internalización de los AuNPRs.** Tras lavar el exceso de AuNPRs se fijaron las células con PFA 4%, se tiñieron con Hoesch 3342 (DNA) y se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal. Experimento representativo para 100 µg/mL de NPR-TG y 200 µg/mL de NPR-T. Las fotografías están tomadas con los mismos parámetros que para las líneas celulares (figura 4.13). **(B) Análisis de la muerte celular** por citometría de flujo utilizando las sondas AnnV y 7AAD. En la gráfica se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los números de los diagramas de puntos corresponden con el porcentaje de células en cada cuadrante. Abajo las células AnnV⁺7AAD⁻ y arriba las células AnnV⁺7AAD⁺. Ctrl: células sin nanoprismas. C+: estaurosporina 1µM. Estadística mediante el análisis t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Siguiendo nuestra línea de investigación, se estudió la toxicidad en macrófagos de ratón. En el caso de los macrófagos no se observa diferencia entre la entrada de los NPRs con o sin glucosa, debido a la alta capacidad fagocítica de éstos (Figura 4.23 A). Además los macrófagos presentan una alta fluorescencia que se ve "quencheada" por los AuNPRs, a mayor concentración de AuNPRs menos autofluorescencia por lo que es muy difícil cuantificar la caída de potencial mitocondrial o la generación de ROS, aunque los datos sugieren que se producen (datos no mostrados). Sí que se analizó la muerte celular, ya que este marcaje permite la diferenciación clara de las distintas poblaciones, aunque al aumentar la concentración de nanoprismas se vayan moviendo. Estos datos sugieren que las nanopartículas tampoco afectan a la viabilidad de los macrófagos (Figura 4.23 B).

4.3.8 Discusión

Esta parte del trabajo realizado ha consistido en investigar la influencia del recubrimiento de los AuNPRs en la internalización y toxicidad celular. Para ello se utilizaron 4 tipos de AuNPRs, todos ellos recubiertos de PEG, polímero considerado de los estabilizadores más eficientes de NPs para aplicaciones biológicas. En concordancia a resultados previos, el PEG previene la internalización de los nanoprismas y la glucosa la favorece [400].

El nivel de internalización de los nanoprismas varía entre distintas líneas celulares, lo que puede deberse a diferentes necesidades de glucosa o propiedades endocíticas. Arvizo y colaboradores han relacionado la internalización de las NPs con su toxicidad [267] por lo que la elección de la línea celular determinará los resultados obtenidos. Por ejemplo la línea celular A549 es comúnmente utilizada como modelo de célula epitelial de pulmón para testar la toxicidad de nanomateriales, pero es conocida por ser muy resistente a la muerte celular inducida por diferentes estímulos incluidas drogas de quimioterapia [35]. Esto indica que para determinar realmente la toxicidad de las NPs es necesario utilizar diferentes tipos de células de distinto origen.

Hemos observado una ligera producción de ROS debido a la internalización de los AuNPRs. Hasta la fecha se han descrito varios mecanismos de generación de ROS en respuesta a la acumulación de NPs dentro de las células. Pueden ser por ejemplo, debido a la degradación de las NPs dentro de los lisosomas o por la activación de la NADPH oxidasa [401, 402]. En algunos estudios se ha observado una relación entre el área de superficie, la generación de ROS y el daño inflamatorio que las partículas generan en los pulmones [315, 403]. Diversos estudios han correlacionado la generación de ROS con diversas modalidades de muerte celular incluidas apoptosis y necrosis [404]. Nel y colaboradores han establecido la generación de ROS como uno de los aspectos citotóxicos más relevantes causado por la internalización de NPs [26]. Sin embargo, otros estudios sostienen que la generación de ROS de forma transitoria no se correlaciona con toxicidad siendo el crecimiento celular el mismo en células con NPs que sin NPs [402].

La generación de ROS es prácticamente inherente al uso de nanopartículas pero que sea tóxica o no depende de los mecanismos que tenga la célula para disminuir estos niveles y el tiempo en el que se mantengan elevados [405]. En condiciones normales se produce la generación de ROS por parte de la mitocondria a niveles bajos que son neutralizados fácilmente por los mecanismos que tiene la célula como el sistema glutation que pasa del estado reducido (GSH) al oxidado (GSSG) [406]. Cuando aumenta el nivel de ROS los sistemas de neutralización de la célula se ven sobrepasados, se acumula GSSG y la célula responde de diferentes maneras. Los mecanismos de

compensación de la elevación de ROS pueden hasta activar la autofagia como mecanismo de defensa [407].

Los resultados obtenidos muestran caída de potencial mitocondrial en todas las líneas y células primarias estudiadas aunque a distintos niveles dependiendo de la línea celular, tipo de AuNPR y concentración. Aunque hay estudios en los que la generación de ROS y la caída de potencial mitocondrial están relacionados con la citotoxicidad [30], otros trabajos sostienen esta caída de potencial mitocondrial como un mecanismo de defensa para contrarrestar el incremento en el nivel de Ca^{2+} citosólico debido a la internalización de NPs [408]. Además, estos autores relacionan la caída de potencial mitocondrial con una mayor resistencia de las células tumorales frente a NPs que son tóxicas para células sanas [267].

Para clarificar estas discrepancias, analizamos la apoptosis y viabilidad de las células expuestas a los AuNPRs. Los resultados muestran que ni los ROS ni la caída de $\Delta\Psi_m$ son suficientes para matar la célula, a diferencia del efecto de la estaurosporina (control positivo), que si que viene acompañado de muerte celular. Estos resultados están de acuerdo con los mencionados anteriormente [408] en los que la caída $\Delta\Psi_m$ puede ser un mecanismo de respuesta para proteger la célula de la internalización de los AuNPRs, más que para inducir su muerte. Como se explicó en la introducción hay dos maneras diferentes de producir caída $\Delta\Psi_m$. Una de ellas es la formación de un poro transitorio (PTP) en el que están implicadas la membrana externa y la interna. Este poro conecta la matriz mitocondrial con el citosol, su formación es transitoria y su apertura se regula por los niveles de Ca^{2+} intracelular y ROS. Si estos niveles disminuyen el poro se cierra y la mitocondria recupera su función [104]. Esto puede explicar los aparentes resultados contradictorios entre los distintos trabajos. Si la mitocondria actúa disminuyendo los niveles de Ca^{2+} citosólico, la caída de $\Delta\Psi_m$ es un mecanismo de defensa [408]. Sin embargo, hay otros estudios en los que la generación de ROS alcanza niveles elevados como para inducir muerte celular [30]. Por lo que utilizar la generación de ROS y caída de $\Delta\Psi_m$ como indicador de toxicidad, depende de la intensidad del estímulo y la capacidad que tenga la célula para contrarrestar estos efectos. Los resultados del apartado anterior en los que se induce muerte celular mediante PTT (apartado 4.2) sostienen esta hipótesis, observándose una mayor producción de ROS y caída de $\Delta\Psi_m$ a mayor nivel que conduce a la muerte celular [240].

Para analizar la viabilidad celular se suele utilizar el test MTT, que es un ensayo colorimétrico basado en la actividad de oxidorreductasas mitocondriales. Sin embargo, este test solo indica el estado de proliferación de la célula, pero no si la célula se está muriendo. Para analizar realmente el efecto de los AuNPRs a largos tiempos, se utiliza el ensayo clonogénico, en el cual se analiza la capacidad que tiene una célula de formar colonias [409].

Resultados y Discusión

Nuestros resultados indican que los AuNPRs no afectan a la viabilidad celular a ningún nivel, incluido daño en el DNA o parada del ciclo celular.

4.4 Efecto de los AuNPRs en la activación de células NK

4.4.1 Introducción al sistema inmune. Células NK

Para poder hablar del efecto de los AuNPRs sobre las células NKs es necesario hacer una pequeña introducción de estas células, sus características y su importancia. Dado que solo aparecen en este apartado de la tesis hemos considerado hacer su introducción aquí.

El sistema inmune está formado por una enorme variedad de células y moléculas que han evolucionado para proteger al animal de la invasión de microorganismos patógenos y del cáncer. La respuesta inmune se puede dividir en dos acciones; el reconocimiento y la respuesta. El sistema inmune es capaz de distinguir diferencias sutiles entre las moléculas extrañas de las propias y entre un patógeno y otro.

En la respuesta inmune participan muchos tipos de células, unas con actividad inespecífica (inmunidad innata) y otras más específica (inmunidad adaptativa). Llamamos células efectoras a las que llevan a cabo la eliminación de la célula tumoral o infectada (células diana), son las células asesinas naturales o NK y los linfocitos T citotóxicos o CTLs. Pero hay otros componentes del sistema inmune que ayudan a la activación y regulación de las células efectoras, como monocitos y macrófagos o células dendríticas.

Las moléculas que reconoce el sistema inmune y desencadenan la respuesta, se denominan antígenos. El reconocimiento selectivo de antígenos permite generar una respuesta adaptada para la eliminación de la célula infectada o transformada de forma específica. Esta respuesta también genera la llamada memoria inmunológica. Las células NK son células citotóxicas que eliminan células infectadas o tumorales pero que carecen de receptores de membrana que reconocen antígeno. Estas células fueron descritas por primera vez en 1975 [410, 411] y forman parte de la inmunidad innata. Las células NK utilizan dos categorías diferentes de receptores, unos proporcionan señales de inhibición y otros de activación, por lo que no reconocen antígenos extraños sino cambios en la expresión de moléculas propias en la superficie de la célula. Algunos de estos cambios son la disminución de la expresión de MHC-I en células infectadas o tumorales [412, 413] y el aumento de ligandos de activación [414]. El equilibrio entre estas señales de activación/inhibición hace que las células NK distingan entre células sanas y tumorales o infectadas [139]. Para que la célula NK se active es necesario que haya señales de activación y si existen señales de inhibición es posible su activación si el balance se inclina a favor de las señales de activación [140, 141] (Figura 4.24).

Las células sanas sin apenas ligandos de activación, presentan niveles altos de MHC-I que suele producir señales de inhibición en las células NK a través de receptores de inhibición. Esto hace que estas células sanas no sean reconocidas por las células NK. Por el contrario, células transformadas o infectadas presentan una disminución del MHC-I y un aumento en la expresión de ligandos de activación convirtiéndose en dianas para las células NK.

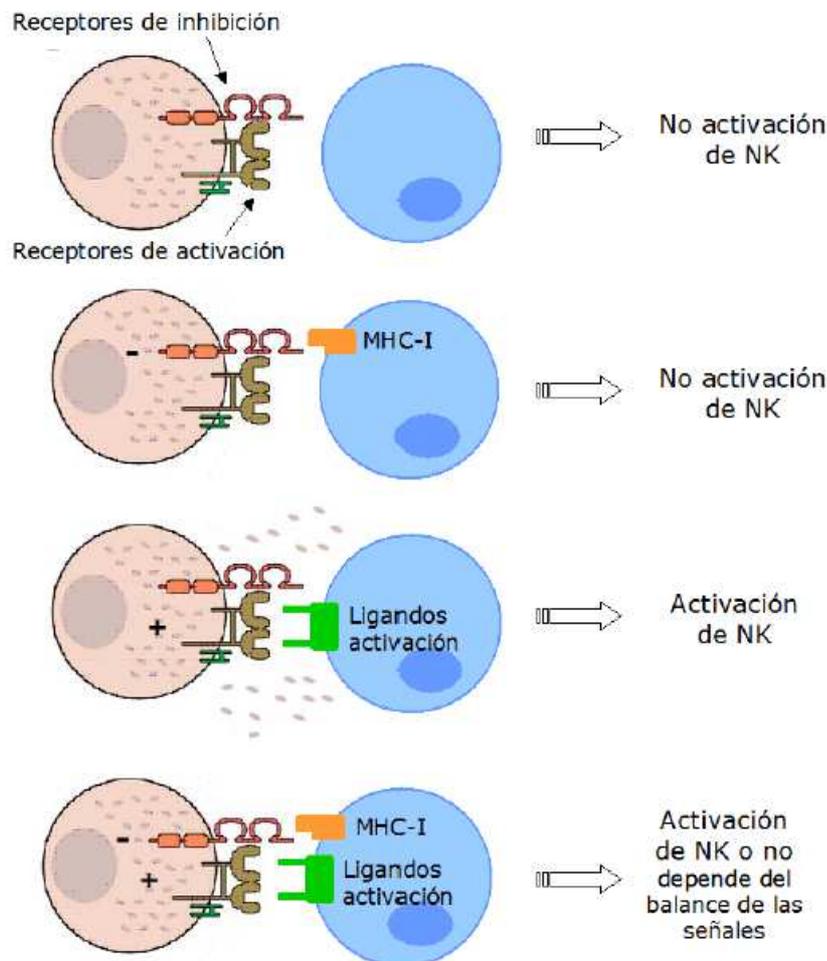


Figura 4.24: Interacciones entre NK (rosa) y células diana (azul). Los signos negativos indican señales inhibitorias mientras que los signos positivos indican señales de activación. Para que la NK se active es necesario que se produzcan señales de activación y en el caso de que existan señales de inhibición el balance tiene que ser favorable hacia la activación. Modificada a partir de Lanier et al [139].

Los receptores de inhibición son de la familia KIR o CD94/NKG2A y reconocen las moléculas MHC correspondientes [415].

Algunos **receptores de activación** pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, los más conocidos son NKp30, NKp44 y NKp46. Otro de los receptores de activación más conocido es el NKG2D que se une a ligandos que presentan una estructura similar al MHC-I (MICA/B) pero que no presentan

antígeno, sino que son expresados en la célula en condiciones de estrés (infección viral, daño en DNA, o radiación UV) [139, 416]. Además, hay factores solubles que activan las células NK como las citoquinas INF- α o β , TNF- α , IL-12, e IL-15. Las células NK también pueden ser activadas a través de CD16 que puede unirse a la región Fc de los anticuerpos produciendo lo que se conoce como citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC, del inglés "Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity"). Esta reacción no es específica, ya que el CD16 se une a la región constante del anticuerpo.

En el caso de que se produzca la activación de las células NK, éstas pueden llevar a cabo su función citotóxica a través de varios mecanismos igual que los CTLs, por degranulación citotóxica (ver 2.1.1.2.3), unión de ligandos mortales a sus receptores en las células diana (ver vía extrínseca 2.1.1.2.2) o secreción de citoquinas y quimioquinas como INF- γ , TNF α y GM-CSF entre otras [417], que activan las células B y T citotóxicas. La activación de las células NK puede ser inmediata, ya que estas células en reposo ya expresan grms, perforina, e INF- γ mientras que los CTLs tienen que sintetizar estas moléculas al activarse.

Es necesario distinguir una subpoblación de estas células llamada NKT. Las NKT poseen CDs propios de células NK como CD16, CD56, pero también CD3 como los linfocitos T. La diferencia es que este CD3 interacciona con la molécula CD1, parecida al MHC I, pero en lugar de péptidos presenta lípidos y glicolípidos [418].

4.4.2 Efecto de los NPR-G en la actividad citotóxica de células NK

En el apartado anterior se ha visto que los AuNPRs no son citotóxicos para las células. Sin embargo, hay otras formas de producir toxicidad que no inducen la muerte de la célula, sino que pueden afectar a su función y por lo tanto ser perjudiciales para el organismo.

Ya que el objetivo para el que se diseñaron los AuNPRs es el tratamiento del cáncer, nos planteamos analizar su efecto en la actividad de células que son importantes para la eliminación de las células tumorales, las células NK. Para analizar si los AuNPRs influirían en su activación y por lo tanto en su función, se obtuvieron PBMCs de la fracción leucocitaria de sangre de donantes sanos (apartado 3.3) y se activaron las células NK con 100 U/mL de IL-2 (apartado 3.6) en presencia de distintas concentraciones de NPR-G (25, 50, 100 y 200 μ g/mL) durante 5 días. Tras el periodo de activación se separaron las células NK mediante MACS (apartado 3.7), y se analizó su capacidad de eliminar células K562 (diana de las NK, ya que carecen de MHC-I).

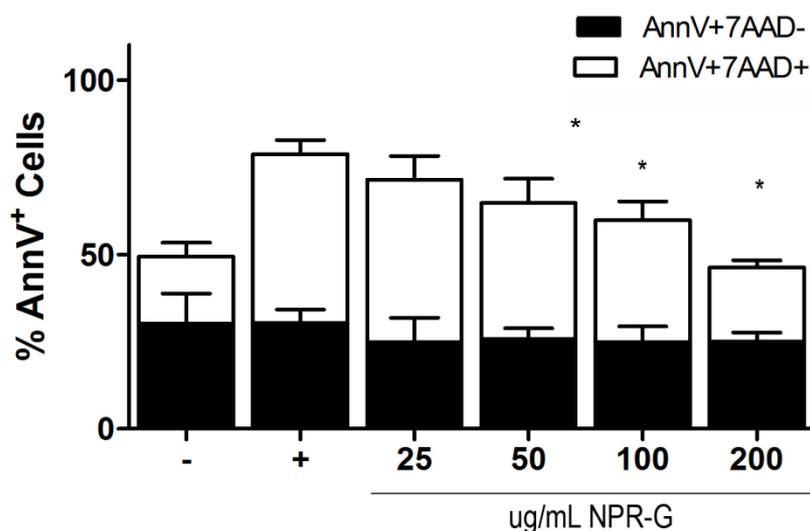


Figura 4.25: Análisis del efecto citotóxico de las células NK activadas en presencia de NPR-G, sobre células K562. Se activaron NKs a partir de PBMCs de donantes sanos con IL-2 durante 5 días en presencia de distintas concentraciones de NPR-G. Se separaron las células NKs mediante MACS, se marcaron con CTG, se enfrentaron a células K562 con un ratio 3:1 y tras 4 h se analizó el porcentaje de células K562 muertas mediante citometría de flujo con la sonda AnnV y 7AAD en la población negativa para CTG como se indica en materiales y métodos. (-) Control de células NK sin activar. Se incubaron sin IL-2 y sin NPRs. (+) Control de células NK activadas. Se activaron en presencia de IL-2 sin NPR-G. En la gráfica se representa la media \pm SEM de 4 donantes independientes. Estadística mediante t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. La estrella corresponde a la comparación con el control +.

Como podemos ver en la figura 4.25, la presencia de NPR-G durante la activación de las células NKs con IL-2 disminuye su efecto citotóxico. La muerte de las células K562 inducida por células NK activadas durante 5 días en presencia de 200 $\mu\text{g/mL}$ de NPR-G, disminuye hasta niveles inducidos por células NK sin activar (-).

Para determinar si este efecto se produce porque se ve afectada la proliferación y viabilidad celular se procedió a contar el total de células en la mezcla de PBMCs tras los 5 días de activación. En la gráfica 4.26 A se representa el % de crecimiento referido a las células activadas sin NPR-G (+). Como se puede observar, la presencia de NPR-G no afecta a la proliferación celular a concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, aunque si se observa una disminución al activar las PBMCs en presencia de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de NPR-G.

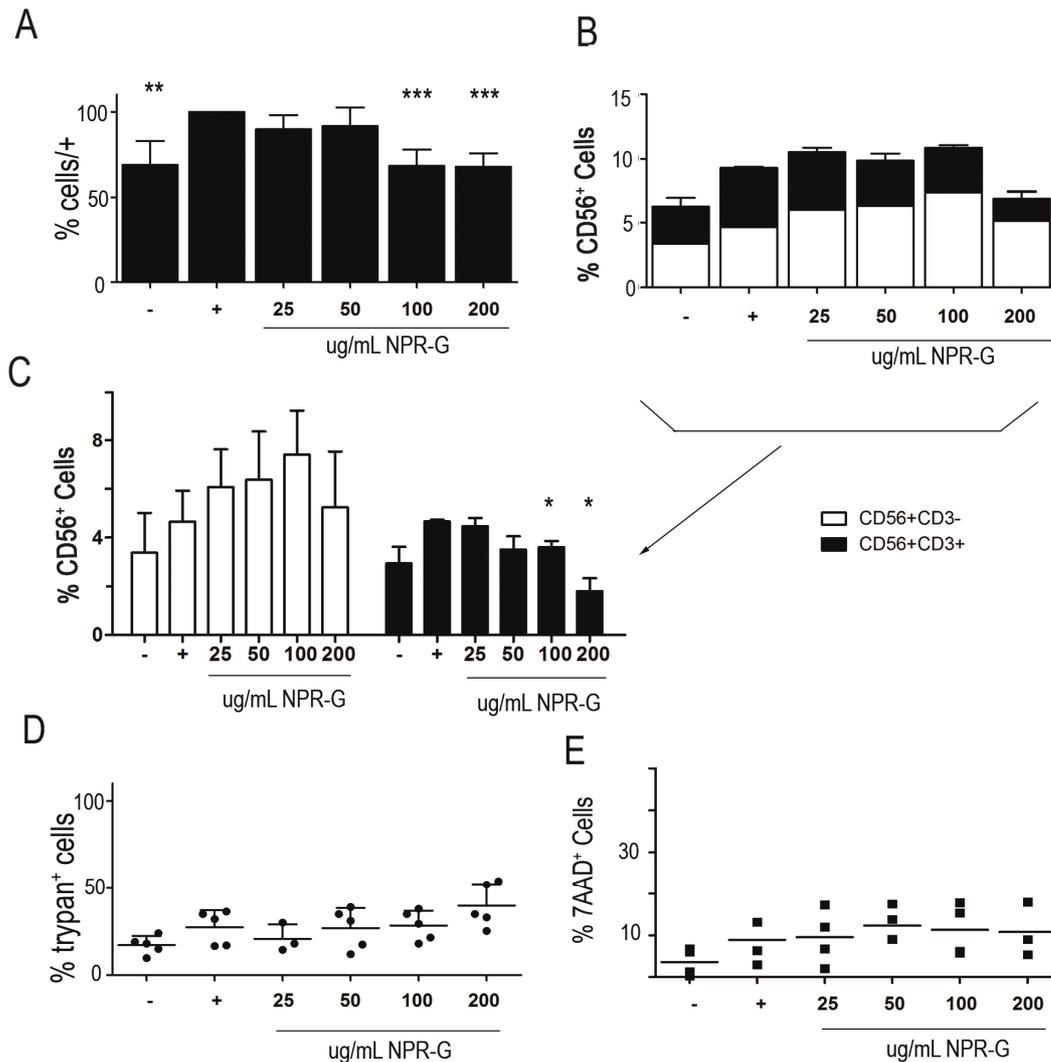


Figura 4.26: Análisis del efecto de AuNPRs sobre la proliferación y viabilidad de PBMCs. Se activaron NKs a partir de PBMCs de donantes sanos con IL-2 durante 5 días en presencia de distintas concentraciones de NPR-G entre 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **(A)** Se analizó el porcentaje de crecimiento de las PBMCs respecto del control +. **(B y C)** Se analizó el porcentaje de células NK en la mezcla de PBMCs activados por citometría de flujo, utilizando anticuerpos que reconocen CD56 y CD3. **(B)** Representación del total de CD56+. **(C)** Representación de las dos poblaciones de células NK por separado. **(D)** Se analizó la muerte de PBMCs tras los 5 días de activación mediante conteo con azul de tripan y **(E)** se analizó la muerte de las células NK que se enfrentaron a las K562 por citometría de flujo, utilizando la sonda 7AAD. Todo ello como se indica en materiales y métodos. (-) Células sin NPR-G y sin IL-2. (+) Células sin NPR-G con IL-2. En las gráficas se representa la media \pm SEM de al menos 3 donantes independientes. Estadística mediante t-student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ respecto al control +.

Para determinar la proporción de células NK en estos cultivos, se procedió a fenotipar la mezcla de PBMCs por citometría de flujo (apartado 3.10.3.1). Como se observa en la figura 4.26 B, la presencia de NPR-G no afecta al porcentaje

de células CD56+ totales (10-12%), hasta la concentración de 200 µg/mL que disminuye aunque no sea estadísticamente significativo. Se puede observar (figura 4.26 C) que dentro de la población de células NK el % de NKT (CD56+CD3+) disminuye conforme aumenta la concentración de AuNPRs. También se observa un aumento en la población de CD56+CD3-, si bien no llega a ser significativo. Por lo que podríamos pensar que los NPR-G alteran la proporción de células en estas 2 poblaciones.

Se analizó la muerte de las PBMCs mediante conteo con azul de tripan. Como se puede observar en la figura 4.26 D, el porcentaje de células muertas al ser incubadas con NPR-G durante 5 días es el mismo que en el control (+). Estos resultados indican que los NPR-G afectan a la actividad de las células NK (figura 4.25) y a la proliferación de PBMCs (figura 4.26 A) pero no provocan la muerte de las PBMCs (figura 4.26 D). Sin embargo, aunque no sea estadísticamente significativo en la gráfica, cabe destacar que para la concentración de 200 µg/mL, se observó un aumento en el porcentaje de células muertas en 2 donantes de un total de 5. Aunque este aumento parece bajo, como el porcentaje de células NK es también bajo podríamos pensar que las células NK se mueren y por eso no matan a las K562. Por ello, se analizó el porcentaje de muerte en las células NK incubadas con las K562 (figura 4.26 E) por citometría de flujo con la sonda 7AAD como se explica en materiales y métodos (apartado 3.11.1). Los resultados muestran que las células NK están vivas, por lo que la disminución de su actividad sobre las células K562 no se debe a una mayor mortalidad.

Dada la reducción en la actividad citotóxica frente a las células K562, se analizó el efecto de los NPR-G sobre la expresión de los receptores de activación más comunes, NKp30, NKp44 y NKp46 (figura 4.27). Según los resultados no se aprecian diferencias en la expresión de NKp46 (A) en las células CD56⁺CD3⁻, ni en la intensidad ni en el porcentaje de células que lo expresan. Las células CD56⁺CD3⁺ no expresan este receptor [419]. La expresión de NKp30 (B) parece aumentar ligeramente con la concentración de NPR-G hasta 100 µg/mL, aunque no es significativo ya que esta tendencia se observó solo en uno de los donantes. No hemos observado expresión de NKp30 en las células CD56⁺CD3⁺. En la literatura hemos encontrado que efectivamente las células NKT no expresan los receptores de activación NCRs [420]. En cuanto a NKp44 (C), aunque hay diferencia en el nivel de expresión de este receptor en los distintos donantes, en todos se mantiene la expresión (MFI), sin embargo el porcentaje de células que expresan NKp44 disminuye al incubarlo con NPR-G. Esta disminución en el porcentaje de células que expresan NKp44 no parece ser la única causa de la disminución de la citotoxicidad, ya que esta bajada no llega a los niveles de las células sin activar (-) mientras que la actividad si que se reduce hasta esos niveles (figura 4.25).

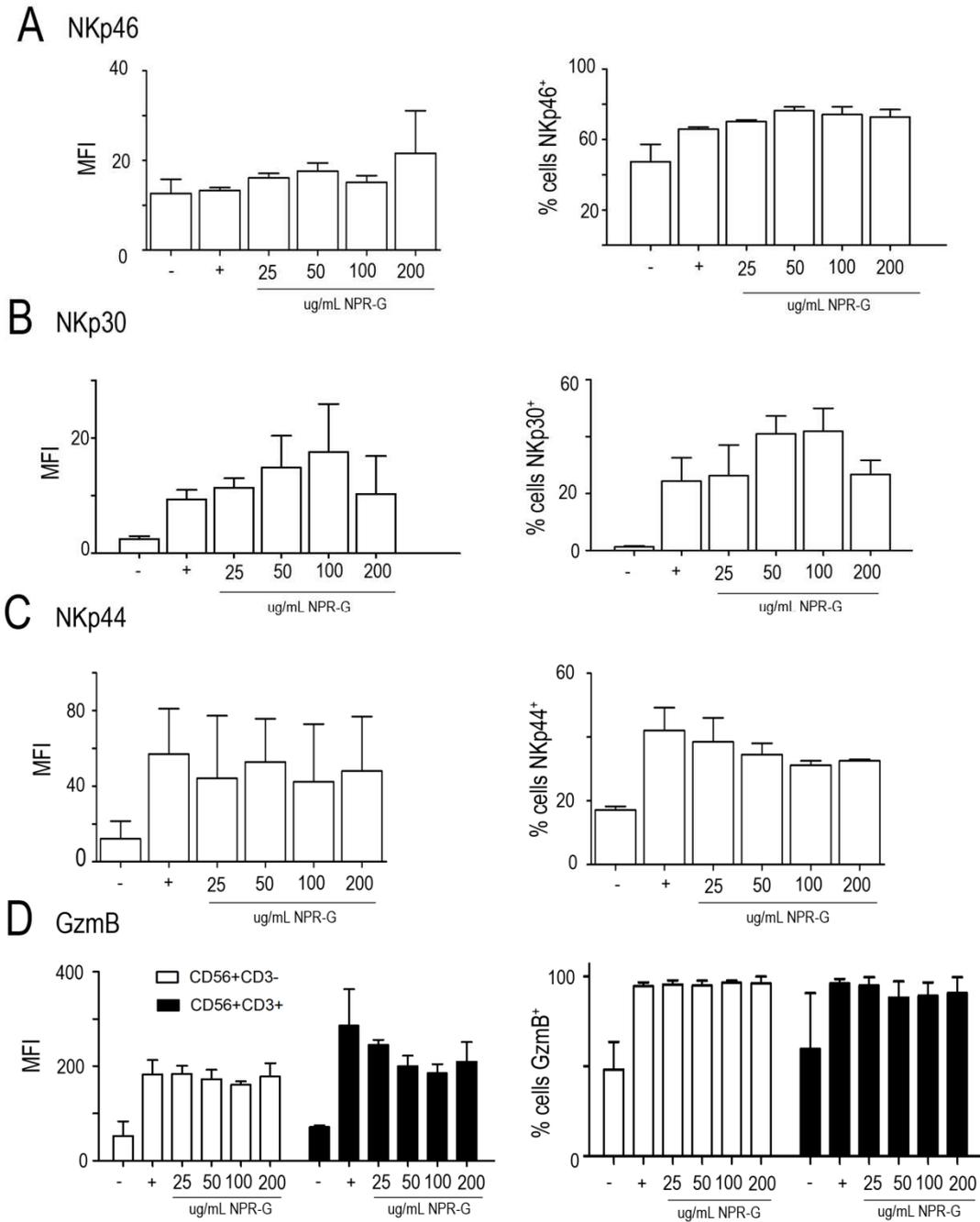


Figura 4.27. Análisis de la expresión de receptores de activación y de gzmB en las células NK. Se activaron NKs a partir de PBMCs de donantes sanos con IL-2 durante 5 días en presencia de distintas concentraciones de NPR-G entre 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizó la expresión de receptores de activación y gzmB por citometría de flujo, tal y como se explica en materiales y métodos. **(A) NKp46 (B) NKp30 (C) NKp44 y (D) Gzmb.** En las gráficas se representa la media \pm SEM de 3 donantes independientes. A la izquierda la intensidad media de fluorescencia (MFI) y a la derecha el porcentaje de células que expresan el receptor correspondiente o gzmB. En blanco células CD56+CD3- y en negro CD56+CD3+. (-) Células sin NPR-G y sin IL-2. (+) Células sin NPR-G con IL-2.

Finalmente, prácticamente la totalidad de las células incubadas con IL-2 expresan GzmB (D) y este número no disminuye con la presencia de NPR-G. Sin embargo en las células NKT (CD56⁺CD3⁺) uno de los 3 donantes presentó una tendencia a disminuir la expresión de gzmB (MFI) al aumentar la concentración de NPR-G.

4.4.3 Discusión

Existen numerosos estudios sobre la inmunotoxicidad de las NPs, los cuales se basan en determinar si las NPs activan el sistema inmune, tanto *in vivo* como *in vitro* [421]. Estos trabajos se centran en analizar la producción de citoquinas pro-inflamatorias, capacidad fagocítica de macrófagos y maduración y actividad de células dendríticas entre otras, es decir analizan si la exposición a las NPs genera una respuesta inmune inflamatoria con consecuencias tóxicas [422]. Sin embargo, nosotros quisimos analizar si los AuNPRs afectan al funcionamiento del sistema inmune, analizando su interferencia en la activación de células NK ya que se ha sugerido que los efectos inmunosupresores de las AuNPs son adversos en la terapia antitumoral [38, 423].

Los resultados muestran una disminución de la actividad citotóxica de las células NK activadas en presencia de NPR-G, frente a las células K562. Este efecto se observa en los 4 donantes utilizados para el estudio, sin embargo la presencia de NPR-G no afecta a la viabilidad de las células NK. Entonces, ¿cómo los AuNPRs podrían afectar a la función citotóxica?

Existen multitud de trabajos en los que las AuNPs no afectan a la viabilidad celular pero se observa una variación en la función de la célula. Se ha visto que la incubación con AuNPs afectan a la secreción de citoquinas por parte de células dendríticas y macrófagos, aumentando la expresión de factores pro-inflamatorios como NO e IL-6 en la línea de macrófagos RAW264.7 (activados con LPS) [424]. En otros trabajos se ha visto que afectan a la secreción de citoquinas en las células dendríticas, disminuyendo la expresión de IL-12 [38] y reduciendo la expresión de MHC-II lo que disminuye su capacidad de estimulación de los linfocitos T [423]. De esta forma se ha sugerido que la presencia de AuNPs puede suprimir la actividad del sistema inmune.

Cambios en las citoquinas presentes en el medio de cultivo durante la activación, podrían ser las responsables de los resultados observados. Las células dendríticas y las NK se activan recíprocamente [425], se ha visto que células NK activadas con IL-2 son potentes activadores de células dendríticas lo que depende del contacto e IFN- γ [426]. Aunque no hay resultados previos con células NK, si que se ha visto una influencia de los AuNPs en la secreción de IL-12 en células dendríticas [38, 423]. Esta interleukina favorece la actividad de las células NK [427] por lo que es posible que se vea alterada por este

efecto o puede ser que los AuNPRs afecten directamente a las células NK. Estos cambios en las citoquinas del medio de cultivo, también explicarían la alteración del porcentaje de células NK y NKT.

Es necesario que las células NK expresen receptores de activación para que actúen. La expresión de los receptores de activación NKp30, NKp46 y NKp44 así como la expresión de la gzmB, no parecen variar al incubar las células con NPR-G. La expresión de NKp44 es un marcador de activación ya que las células sin activar no lo expresan [428]. Por otro lado la expresión de gzmB aumenta con la activación. Estos resultados nos pueden sugerir que las células NK se activan. Sin embargo, es necesario explicar la disminución del porcentaje de células que expresan NKp44 al aumentar la concentración de NPR-G, a pesar de que no sea significativo. Esta posible disminución, podría tener un efecto en la reducción de la actividad citotóxica de las células NK pero no ser la única causa. La actividad citotóxica de las células NK incubadas con 200 µg/mL de NPR-G desciende hasta niveles comparables a la que ejercen las células NK sin activar, sin embargo el porcentaje de células que expresan NKp44 no baja hasta esos niveles. Estos resultados sugieren que la expresión de NKp44 podría verse alterada por la presencia de AuNPRs, por lo que podría tener algún efecto en la actividad de las células NK, pero seguramente hay otros motivos.

Se ha visto que la inhibición de NKG2D, DNAM-1, NKp44 y NKp46 disminuye en mayor o menor grado la degranulación de células NK en la línea celular Nishi [429]. Para que una célula NK ejerza su función es necesario que se produzca la sinapsis inmunológica, que se define como el contacto entre dos células (una de ellas del sistema inmune) que resulta en la secreción de moléculas a la zona intercelular. En la interacción entre la célula NK y la diana intervienen varias moléculas, por un lado moléculas de adhesión como LFA-1 que desencadena la polimerización de los filamentos de actina hacia la zona de sinapsis y por otro los receptores de activación que reclutan moléculas que participan en la transducción de señales importantes para la degranulación, como la polarización del MTOC (microtubule-organizing center) necesaria para el acercamiento de los gránulos a la zona de contacto entre las dos células [430]. Por lo tanto el problema puede deberse a la expresión de estas moléculas de adhesión o de otros receptores de activación que no hemos analizado como NKG2D o DNAM-1.

Hasta ahora hemos explicado la posibilidad de que los AuNPRs interfieran en la transducción de señales que movilizan la degranulación citotóxica, afectando a la expresión de receptores que intervienen en ello. Sin embargo, el hecho de que las NPs se localicen en endosomas [240], sugiere que pueden interferir con el tráfico de los gránulos citotóxicos y/o su fusión con la membrana. Algunos estudios han mostrado que la presencia de NPs cargadas

localizadas en endosomas disminuyen la degranulación de los mastocitos peritoneales de ratón [431]. También se ha observado que las AuNPs producen la degradación de proteínas del citoesqueleto en neutrófilos [432]. La desorganización del citoesqueleto resulta en una disfunción de la actividad de las células NK [433], por lo que el efecto de los AuNPRs podría deberse a esto.

Nuestros resultados indican que la presencia de AuNPRs interfiere en la actividad de las células NK sin afectar a su viabilidad. Esto parece que no se debe a una disminución en la expresión de los receptores de activación NKp30 y NKp46 aunque debido a la variabilidad en la expresión de los receptores en los distintos donantes, la influencia de los AuNPRs sobre NKp44 queda por determinar, si bien sugiere que haya otras causas. Queda pendiente un estudio más exhaustivo del efecto sobre la degranulación.

4.5 Toxicidad y biodistribución de los AuNPRs *in vivo*

La biodistribución y por lo tanto la posible toxicidad de las NPs *in vivo*, depende de muchos factores y es por lo tanto necesario su estudio, en etapas tempranas del desarrollo de las NPs para poder influir en su diseño y obtener los resultados deseados.

Así nos planteamos analizar la distribución de los AuNPRs a corto (3 días) y largo plazo (4 meses), para determinar si se acumulan en algún órgano y su toxicidad. Para ello utilizamos ratones de la cepa Swiss machos y hembras de 6-7 semanas de edad procedentes del animalario del CIBA a los cuales se les inyectó 6 µg/g de NPR-TG vía intravenosa (apartado 3.19). Al grupo control se le inyectó PBS. Estas cantidades corresponden a una concentración en sangre de unos 75-100 µg/mL, que está dentro del rango de las analizadas en los apartados de toxicidad *in vitro* (apartados 4.3 y 4.4) y se asemeja mucho a la utilizada para el estudio de hipertermia en el apartado 4.2.

Tras 3 días o 4 meses de la administración de los AuNPRs, se sacrificaron los animales, se les extrajo sangre y los órganos que se pesaron y analizaron por histología, ICP-MS y TEM, como se explica en materiales y métodos.

4.5.1 Biodistribución de AuNPRs

4.5.1.1. Biodistribución de AuNPRs a los 3 días de su administración

Se han utilizado diferentes métodos para analizar la localización de las NPs en los distintos tejidos, por ejemplo radioactividad [434] o fluorescencia [435]. Nosotros utilizamos el fluoróforo TAMRA que está unido al PEG que recubre el nanoprisma (ver apartado 3.4.2).

Para determinar la distribución de los NPR-TG a los 3 días de su administración, se analizaron por microscopía de fluorescencia (TAMRA) muestras histológicas de los principales órganos; hígado, bazo, pulmones, riñones, corazón, testículos y ovarios y no se observó fluorescencia en ninguno de ellos. Por otro lado, sí que se observó fluorescencia en las orinas de los ratones recogidas a las 24 h de la administración (figura 4.28 A). Para confirmar esta observación se cuantificó la fluorescencia de las muestras de orina en un espectrofluorímetro (a 620 nm excitando a 560 nm), tras diluirlas todas al mismo volumen final. Los resultados que se muestran en la figura 4.28 B confirman la eliminación de TAMRA por la orina en 24 h.

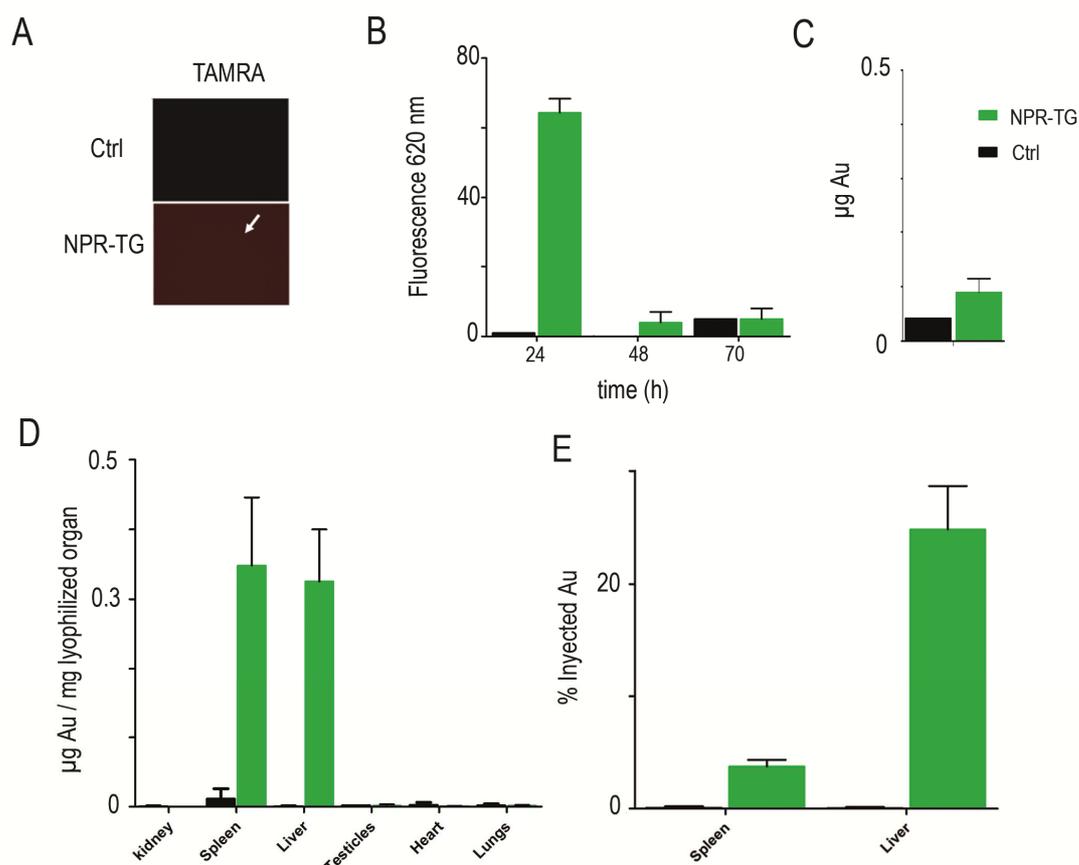


Figura 4.28: Estudio de la biodistribución de NPR-TG en ratones Swiss tras 72h.

Se inyectaron 6 µg/g de NPR-TG vía intravenosa, se recogió la orina cada 24h y se sacrificaron los ratones a las 70h. Se extrajeron los órganos, se liofilizaron y procesaron como se indica en materiales y métodos para analizar la cantidad de oro por ICP-MS. **(A)** Microscopía de fluorescencia de las orinas recogidas 24 h tras la administración de NPR-TG **(B)** Cuantificación de la fluorescencia del TAMRA en orina mediante espectrofluorimetría (Excitación 560±40, emisión 620±40 nm). **(C)** Determinación de la cantidad oro de la orina de 24 h por ICP-MS. **(D)** Determinación de la cantidad de oro en los distintos órganos, en relación al peso del órgano, por ICP-MS a los 3 días. **(E)** Porcentaje de oro en cada órgano respecto del total inyectado. En las gráficas se representa la media ± SEM de al menos 3 ratones en el grupo tratado y 1 ratón como control.

Estos datos fueron inesperados, ya que el tamaño de los NPR-TG es demasiado grande para que se eliminen por la orina [436]. Por lo que se cuantificó por ICP-MS la cantidad de oro en orina y en los distintos órganos, como se explica en materiales y métodos (apartado 3.17). Como se observa en la figura 28 C no se detectó oro en orina, pero sí en el bazo e hígado (figura 28 D), acumulándose en los dos órganos la misma proporción según su tamaño (unos 0.4 µg/mg órgano liofilizado). Esta biodistribución es la que corresponde a NPs de gran tamaño [437]. Se cuantificó el total de NPR-TG acumuladas y como se observa en la figura 4.28 E, el 30-35% de los NPR-TG inyectados

permanecen en hígado y bazo. Siendo el hígado el principal almacén de NPR-TG (25%) debido a su mayor tamaño. El resto puede permanecer en sangre, acumularse en otros órganos que no hemos analizado o haber sido eliminadas por heces. Para determinar la posibilidad de que los AuNPRs se eliminen por el sistema hepato-biliar, se cuantificó por ICP-MS la cantidad de oro en heces de los 3 días que dura el experimento, pero lamentablemente a fecha de impresión de esta tesis, no tenemos los resultados.

Estos resultados sugieren que los AuNPRs a los 3 días de la administración se acumulan en bazo e hígado y que el fluoróforo TAMRA se suelta de los AuNPRs y se elimina por la orina en 24 h. Lo que está en concordancia con los resultados de Kreyling y colaboradores en los que marcando radiactivamente el núcleo y la cubierta observaron que el núcleo de las AuNPs se acumulaba en hígado, mientras que fragmentos de la cubierta se eliminaban por el riñón [438].

4.5.1.2. Biodistribución de los AuNPRs tras 4 meses de su administración

Para estudiar si estos AuNPRs se eliminan con el tiempo o permanecen en el bazo e hígado, se analizó la cantidad de oro por ICP-MS en estos órganos y en el riñón por ser una de las vías de eliminación. Los resultados indican que los NPR-TG a los 4 meses se siguen acumulando en bazo e hígado (figura 4.29 A), siendo el bazo el órgano donde más se acumula en proporción a su tamaño (unos 0.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ órgano liofilizado). Analizando el porcentaje de oro que hay en cada órgano respecto del total de NPR-TG inyectados, podemos observar (figura 4.29 B) que un 3-5% de los NPR-TG inyectados se acumulan en bazo, mientras que un 10-15% permanece en hígado 4 meses después de la administración. Lo que hace un total del 20% de los AuNPRs inyectados. Comparando la acumulación de oro a los 3 días (figura 4.28 D) y a los 4 meses (figura 4.29 B) se observa que la cantidad de NPR-TG que se acumulan en el bazo a los 3 días es la misma que a los 4 meses (un 5%), sin embargo la cantidad de oro acumulado en hígado disminuye, pasando de acumular el 25% de los NPR-TG inyectados a los 3 días al 10% a los 4 meses. Lo que indica que la cantidad de oro que se acumula en el hígado disminuye con el tiempo.

Como el oro no puede ser metabolizado por las células, o pasa a sangre y se acumula en otros órganos o es eliminado del organismo. Existen dos tipos de vías de eliminación, la renal y la hepato-biliar. Según los resultados obtenidos a los 3 días (figura 4.28 C) los AuNPRs no se eliminan por orina. Con los datos de ICP-MS de las heces recogidas durante los 3 primeros días, sabremos si es posible que estos AuNPRs, cuya cantidad en el hígado disminuye, pueden ser eliminados por el sistema hepato-biliar.

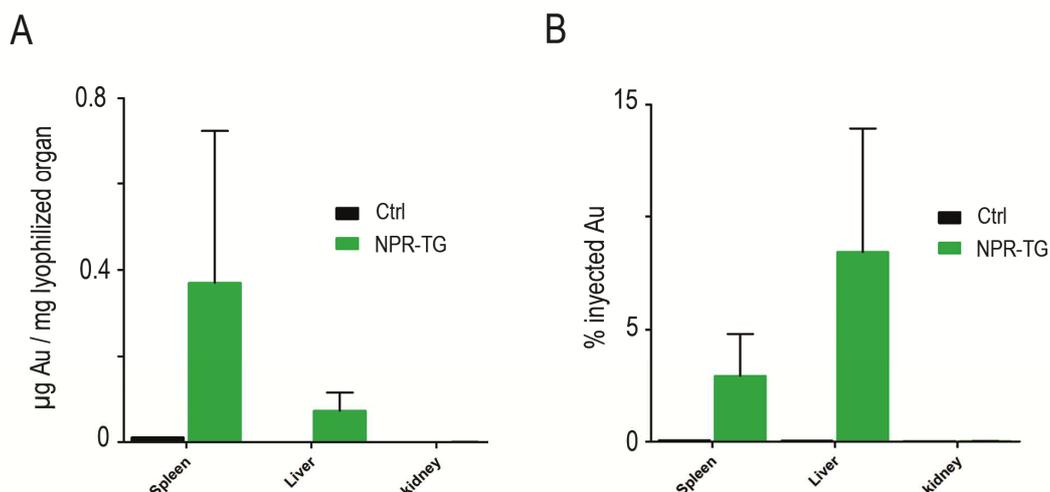


Figura 4.29: Estudio de la biodistribución de NPR-TG en ratones Swiss tras 4 meses. Se inyectaron 6 µg/g de NPR-TG, vía intravenosa en ratones Swiss de 6 semanas de edad. Tras 4 meses se sacrificaron los ratones, se extrajeron los órganos, se liofilizaron y se procesaron como se indica en materiales y métodos para analizar la cantidad de oro por ICP-MS. El control fue tratado con PBS. **(A)** Cuantificación de la cantidad de oro por mg de órgano liofilizado. **(B)** Porcentaje de oro del total administrado que queda retenido en los órganos tras 4 meses. En las gráficas se representa la media \pm SEM de 3 ratones.

Se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) el bazo y el hígado de un ratón tratado con NPR-TG tal y como se indica en materiales y métodos (apartado 3.16). Como se muestra en la figura 4.30 se puede observar la presencia de AuNPRs en los dos tejidos, confirmando los resultados de ICP-MS (figura 4.29). Estos AuNPRs se localizan en lo que parecen ser macrófagos, por su contenido en endosomas de alta densidad. Estos resultados fueron confirmados además por microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM). Como se puede observar en la figura 4.31, las estructuras observadas, de morfología variable se componen de oro.

Estos resultados muestran una morfología de las AuNPs variable. Se pueden observar AuNPs más pequeñas y de estructura variable y amorfa, cuando el tamaño medio de los AuNPRs originales debería ser de 150 nm de arista y el contenido en esferas es reducido. Estos resultados podrían indicar que la estructura de los AuNPRs cambia al almacenarse en bazo e hígado, o que los AuNPRs que quedan retenidos son los que tienen esta morfología y tamaño. Recordar que solo un 20 % de los AuNPRs permanecen en bazo e hígado a los 4 meses. En este aspecto queda pendiente una comprobación de la morfología de los AuNPRs originales que se inyectaron mediante la misma técnica.

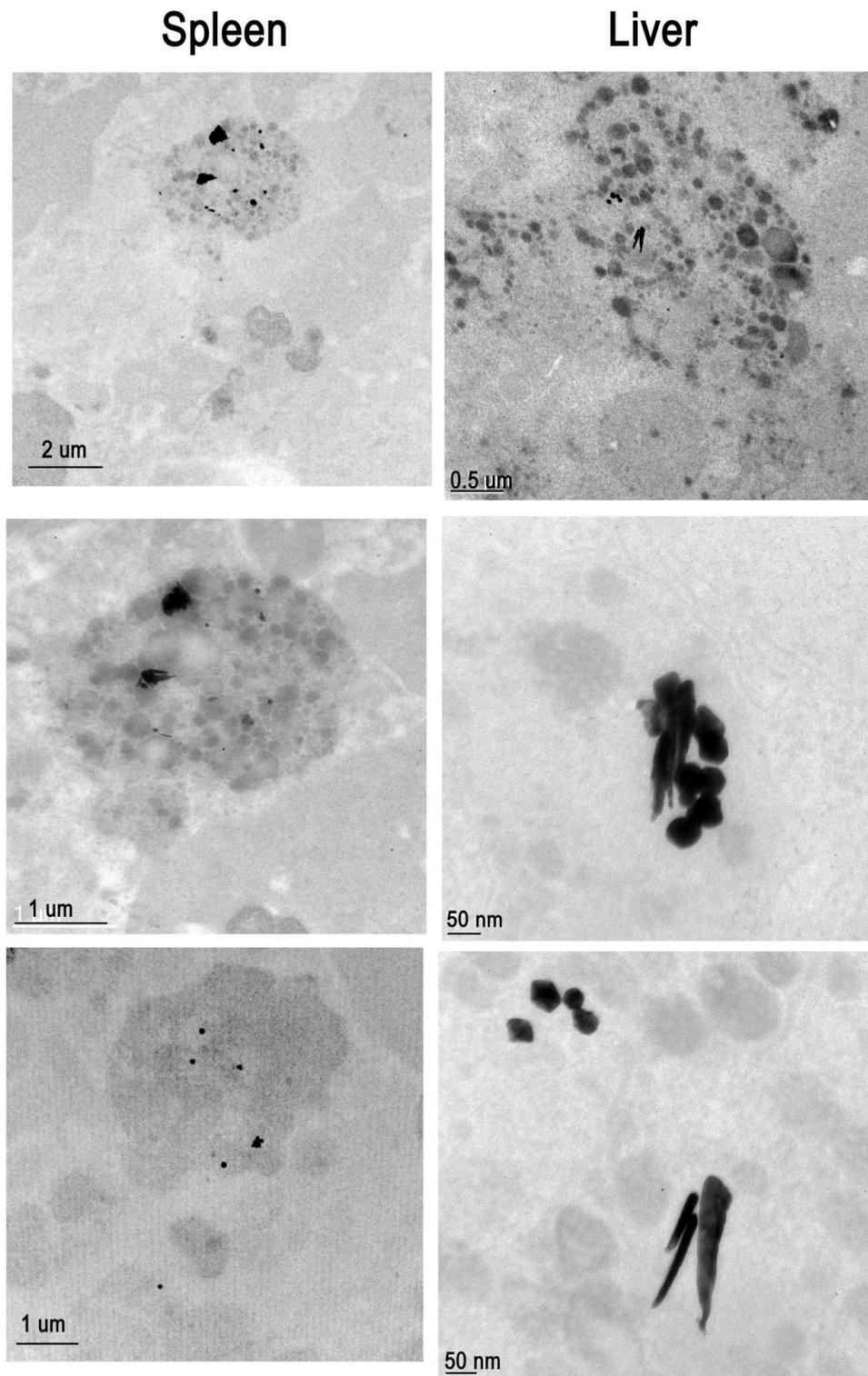
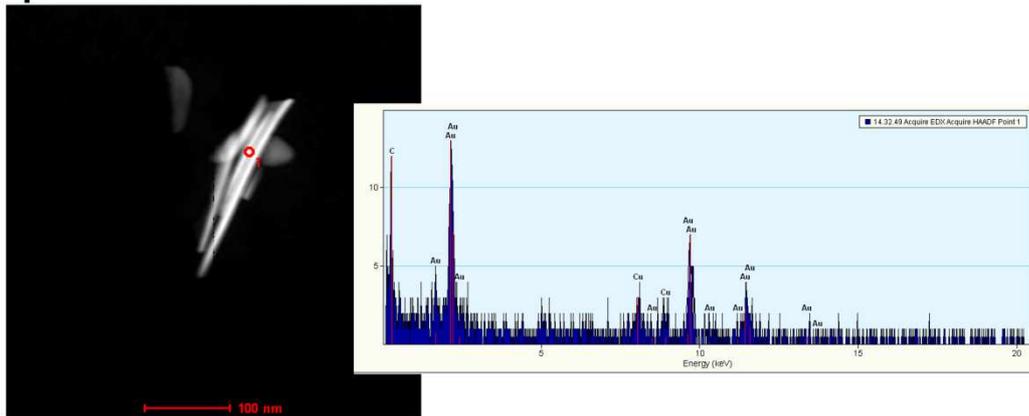


Figura 4.30: Imágenes de TEM de AuNPR en (A) bazo y (B) hígado de un ratón tratado. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG, vía intravenosa en ratones Swiss de 6 semanas de edad y tras 4 meses se sacrificaron los ratones, se extrajeron los órganos, se fijaron y se procesaron para su análisis por TEM como se indica en materiales y métodos. El control fue tratado con PBS. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico TITAN con corrección de imagen con una cámara CCD GATAN a 80 KV de HT.

Spleen



Liver

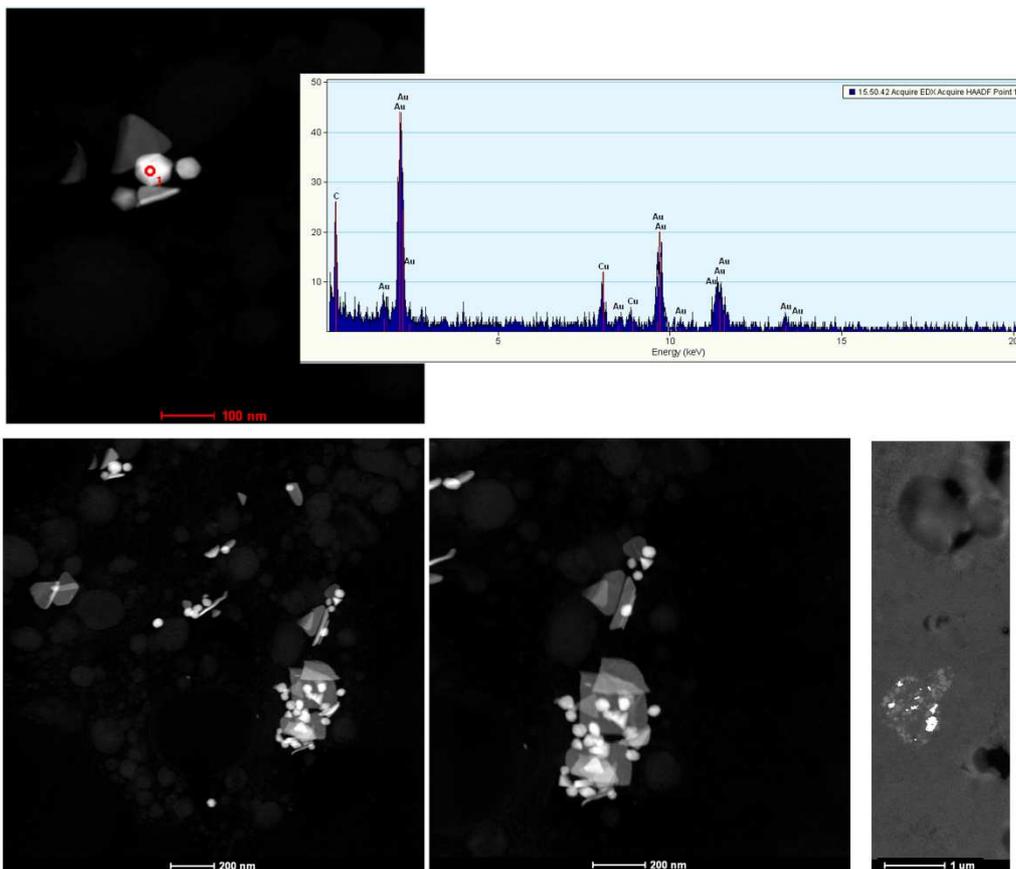


Figura 4.31: Imágenes de STEM de AuNPR en bazo e hígado de un ratón tratado. Se inyectaron 6 μg/g de NPR-TG, vía intravenosa en ratones Swiss de 6 semanas de edad y tras 4 meses se sacrificaron los ratones, se extrajeron los órganos, se fijaron y se procesaron para su análisis por STEM como se indica en materiales y métodos. El control fue tratado con PBS. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico STEM TITAN corregido, con una cámara CCD GATAN y con un detector EDX (EDAX).

4.5.2 Toxicidad de NPR-TG

Es necesario distinguir entre toxicidad aguda y toxicidad crónica, ya que es posible que las NPs sean tóxicas al principio, pero que con el paso del tiempo los órganos se recuperen, o que en los primeros días no afecten al funcionamiento del órgano, pero que con el tiempo la acumulación de NPs resulte tóxica.

Para analizar la toxicidad se hizo un seguimiento del peso del ratón mientras duró el tratamiento. Tras el sacrificio se extrajo sangre y se analizaron marcadores toxicológicos sanguíneos. También se extrajeron los órganos que se analizaron por histología (apartado 3.19.3).

4.5.2.1. Toxicidad aguda de los AuNPRs

Una primera aproximación para evaluar el estado del ratón es el seguimiento del peso, así como su apariencia y nivel de actividad. Tal y como muestra la figura 4.32 A no se observaron diferencias significativas con el grupo control en la ganancia de peso en los tres días que duró el experimento, así como tampoco se observaron cambios en la apariencia y comportamiento de los animales.

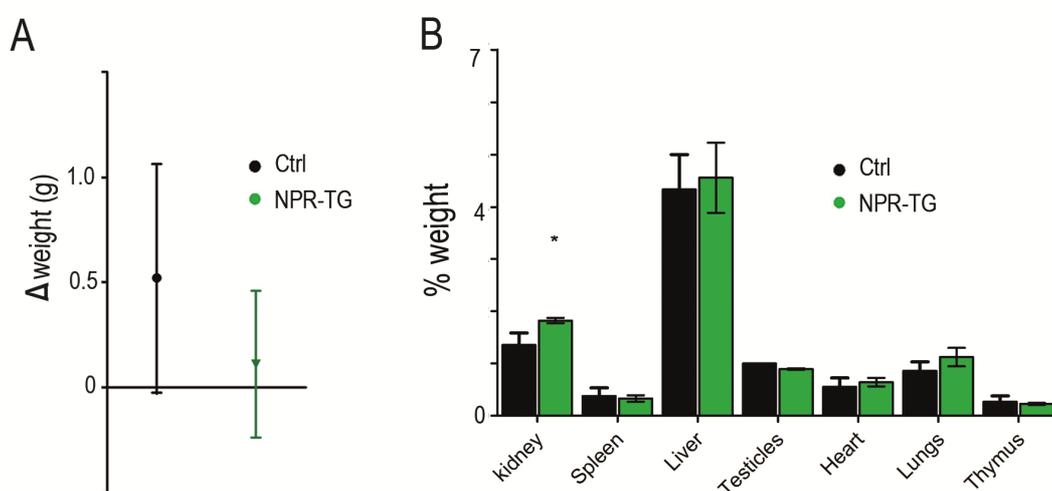


Figura 4.32: Estudio de la toxicidad de NPR-TG en ratones Swiss tras 72 h de su administración. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG y al grupo control se le administró PBS. Los ratones se sacrificaron a las 70h como se indica en materiales y métodos. Tras el sacrificio se extrajeron los órganos y se pesaron. **(A)** Se pesaron los ratones al comienzo y al final del procedimiento. La gráfica representa la ganancia de peso de los ratones en 72 h. **(B)** En la gráfica se representa el peso de los órganos respecto al peso del ratón. Se representa la media \pm SEM de al menos 3 ratones.

Otra aproximación para evaluar el estado del animal es el pesaje de los órganos. El peso del órgano varía dependiendo de su estado nutricional, edad

y la localización geográfica, por lo que los datos se refieren al peso total del ratón, lo que ayuda a normalizar esta variabilidad [439]. Los resultados que se observan en la figura 4.32 B, muestran que no hay diferencias significativas en el peso de los órganos excepto en el riñón, que aumenta ligeramente de peso.

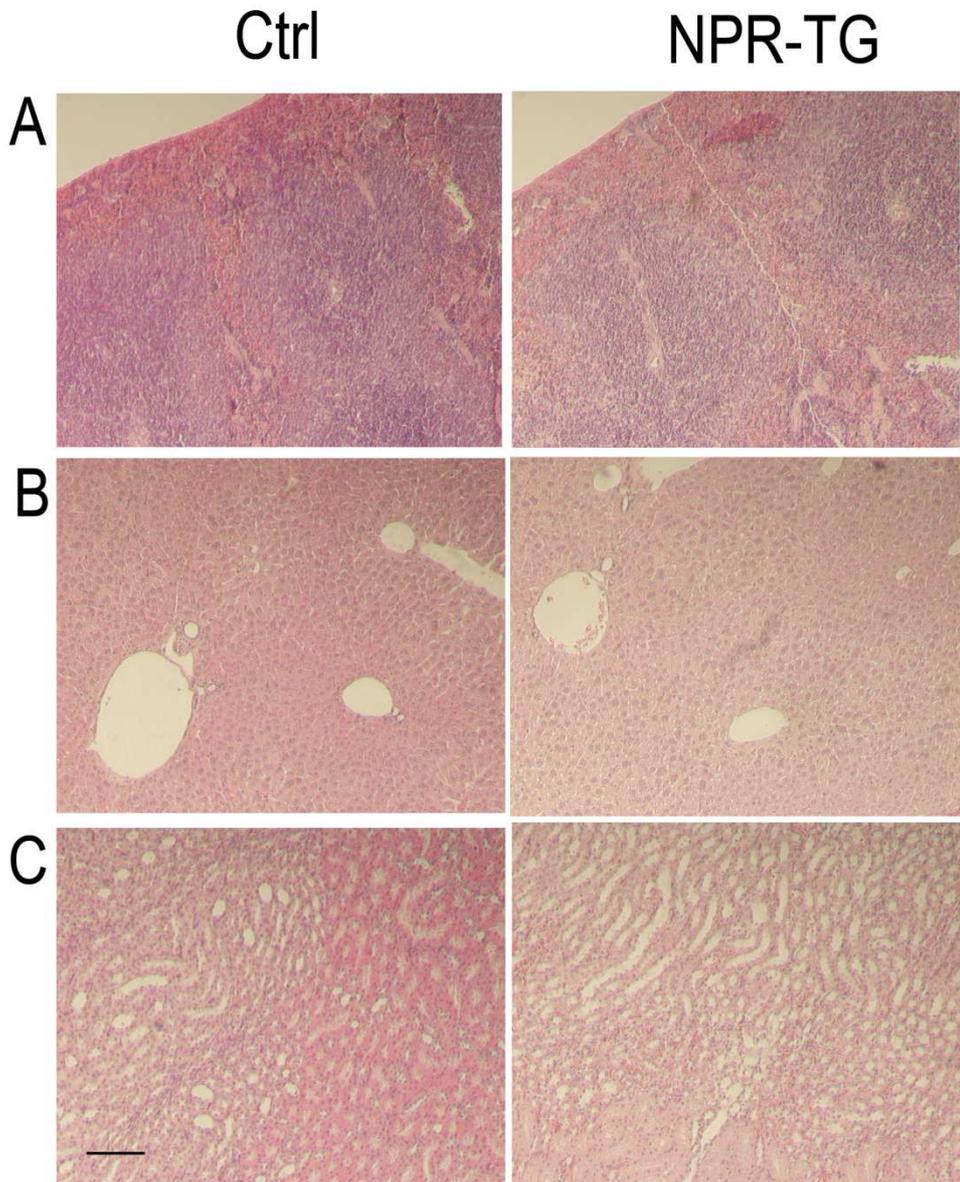


Figura 4.33: Estudio de anatomía patológica en ratones tratados con NPR-TG y controles a los 3 días del tratamiento. (A) bazo, (B) hígado y (C) riñón. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG y a las 70 h se sacrificaron y se fijaron los órganos en PFA 4% para su inclusión en parafina, tal y como se indica en materiales y métodos. Se muestra un ratón de cada grupo de modo representativo, ya que no se observaron cambios histológicos en ninguno de los órganos debidos al tratamiento. Escala 100 μm .

Para evaluar en detalle el estado del órgano, es necesario un estudio histológico. La evaluación de las muestras fue llevada a cabo por el Dr. Marcelo

de las Heras, del laboratorio de Patología Comparada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

No se observaron cambios histológicos en ninguno de los órganos analizados (higado, bazo, timo, corazón, pulmón, riñones y testículos). Es decir, el aumento de tamaño de los riñones no se corresponde con una lesión del tejido (Figura 4.33). No se observaron tampoco cambios relevantes en las células de Kupffer en ninguno de los ratones. Lo que está de acuerdo con la mayoría de estudios en los que a pesar de la acumulación de AuNPs en los órganos, éstos no presentan daños [277].

Cabe destacar la observación de una lesión en una de las arterias pulmonares de un ratón tratado con NPR-TG (figura 4.34). Esta lesión corresponde a un pequeño granuloma o una lesión cicatrizal que tendría un tiempo superior a 3 días, por lo que no se asocia con la inyección de NPR-TG. Sin embargo, llama la atención la observación de unas células que contienen pigmentos negruzcos, que podrían tratarse de NPR-TG. Para comprobarlo, junto con el análisis de heces, se está llevando a cabo un análisis de cuantificación de oro por ICP-MS de este pulmón.

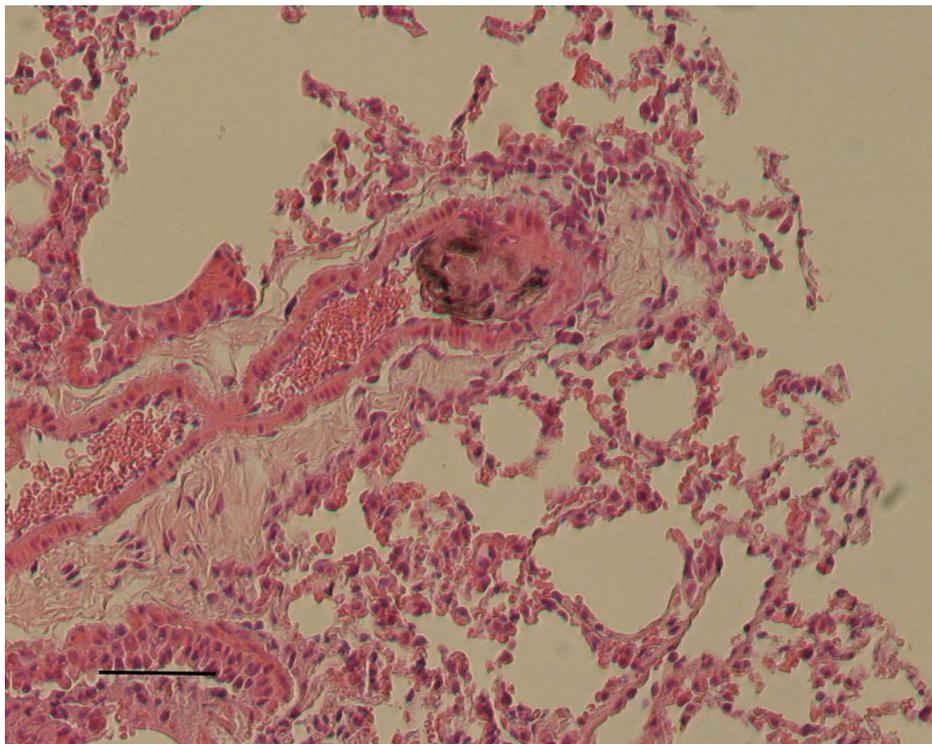


Figura 4.34: Lesión en el pulmón de un ratón tratado con NPR-TG. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG y a las 70 h se sacrificaron y se fijaron los órganos en PFA 4% para su inclusión en parafina y marcaje HE, tal y como se indica en materiales y métodos. En la imagen se puede observar un pigmento negro que podría corresponder con AuNPRs. Escala 100 μm .

4.5.2.2. Toxicidad crónica de los AuNPRs

Durante 4 meses se hizo un seguimiento semanal del peso de los ratones. Como se observa en la figura 4.35 A, no hay diferencias significativas en el crecimiento de los ratones tratados con NPR-TG (verde), del grupo control (negro). Tampoco hay diferencias en el porcentaje de peso de los distintos órganos (figura 4.35 B). Por lo que el aumento del tamaño del riñón a los 3 días, con el tiempo se recupera ya que no se observan diferencias a los 4 meses.

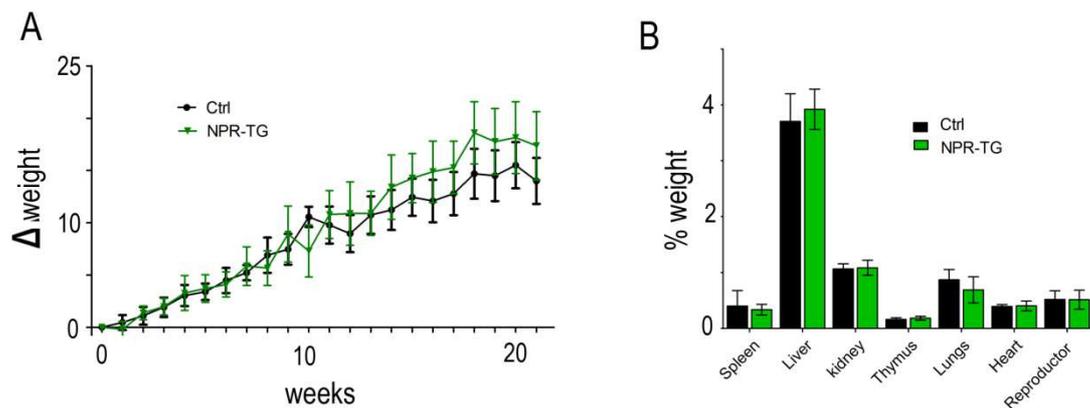


Figura 4.35: Toxicidad de NPR-TG en ratones Swiss tras 4 meses. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG y se sacrificaron a los 4 meses. **(A)** Ganancia de peso semanal de los ratones durante el procedimiento. **(B)** Peso de los órganos respecto al peso del ratón. En las gráficas se representa la media \pm SEM de al menos 5 ratones.

El estudio patológico (figura 4.36) muestra en los ratones tratados con NPR-TG, hepatocitos en general más voluminosos con citoplasmas más espaciosos. Se observa la formación de varias vacuolas que agrandan el tamaño celular. Este cambio se experimenta con más frecuencia e intensidad en la zona central lobulillar. Estos cambios serían compatibles con los que se describe como cambio hidrópico o degeneración vacuolar. No se observan muchos cambios nucleares aunque en algunos casos dan la impresión de ser más pequeños con la cromatina más concentrada en la membrana nuclear. También se observó un aumento en lo que parecen ser adipocitos, ya que carecen de núcleo. Asimismo, se observó la presencia de células de Kupffer con citoplasma más amplio y conteniendo un pigmento de color rojuzco, que podría corresponder con los NPR-TG ya que no se ha observado en los ratones control.

Estos cambios se observan en todos los ratones tratados con NPR-TG en mayor o menor grado, excepto en uno ($n = 9$).

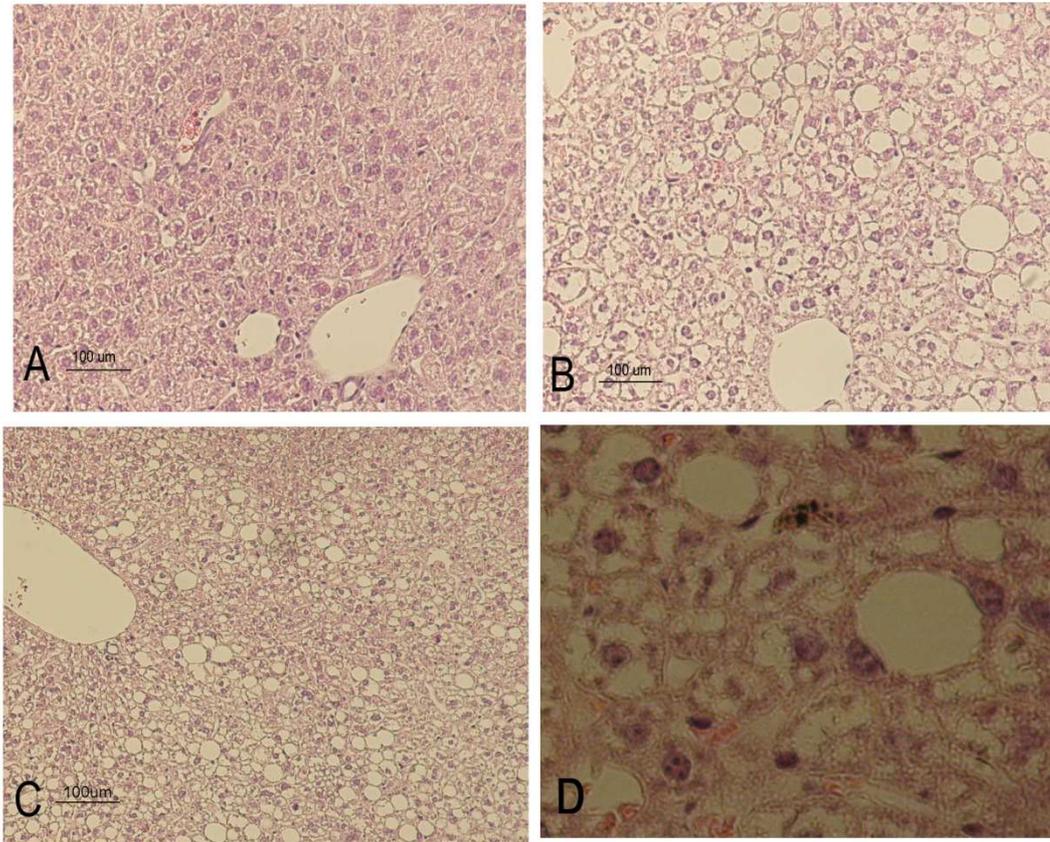


Figura 4.36: Estudio de anatomía patológica del hígado de ratones tratados con NPR-TG a los 4 meses del tratamiento. Se inyectaron 6 µg/g de NPR-TG y a los 4 meses se sacrificaron y se fijaron los órganos en PFA 4% para su inclusión en parafina, tal y como se explica en materiales y métodos. Se muestra **(A)** el aspecto de los hepatocitos de un ratón control. **(B)** Hígado de un ratón tratado con NPR-TG donde se puede observar vacuolas grandes. **(C)** Hígado de un ratón tratado con NPR-TG con citoplasma algo más grande **(D)** Imagen a grandes aumentos donde se aprecian células compatibles con células de Kupffer con un contenido de material granular pigmentado de color negro.

En los bazos no se observaron cambios reseñables en su estructura (figura 4.37 A y B), la pulpa blanca se encuentra hipertrofiada moderadamente pero no se llega a alterar de forma importante la arquitectura del órgano. Sí se observaron macrófagos en la pulpa blanca con dos materiales distintos depositados en el citoplasma, uno de tipo granular de color negro que sería compatible con AuNPRs ya que no se observa en los ratones control y otro formando depósitos más difusos de color caramelo que podría corresponderse con depósitos de hierro (Figura 4.37 C y D).

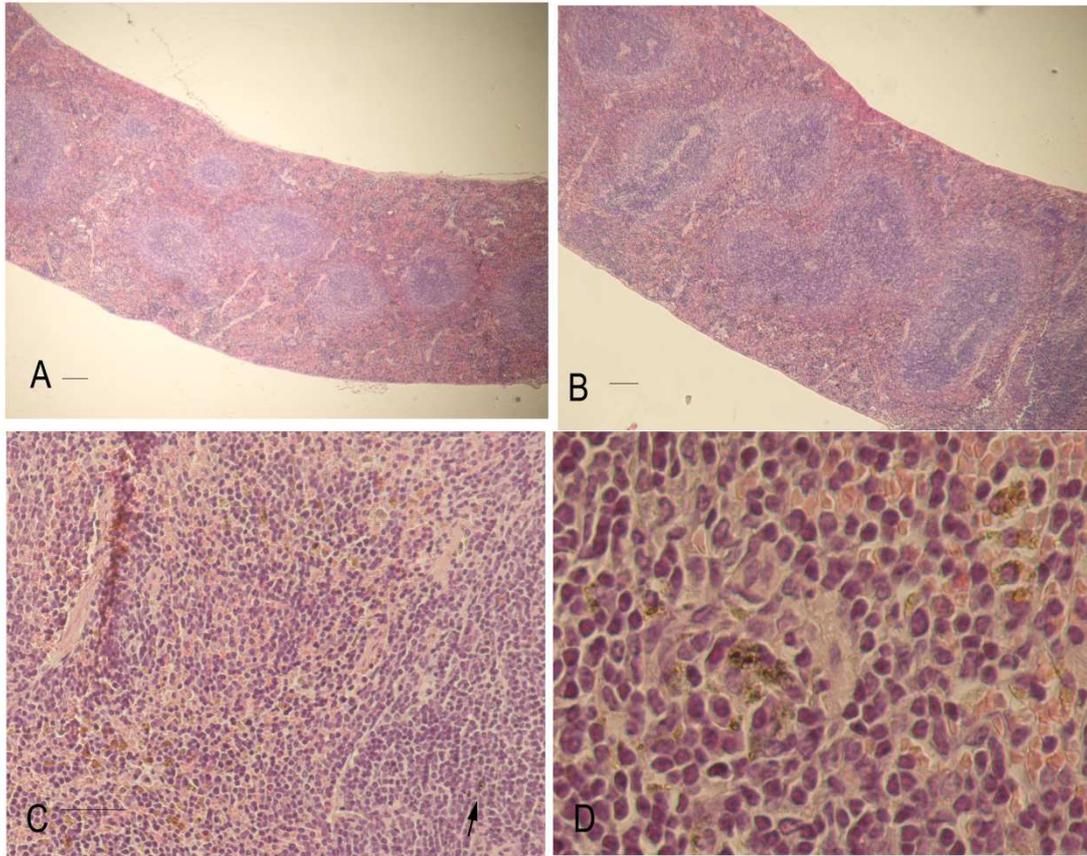


Figura 4.37: Estudio de anatomía patológica de los bazo de ratones tratados con NPR-TG a los 4 meses del tratamiento. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG y a los 4 meses se sacrificaron y se fijaron los órganos en PFA 4% para su inclusión en parafina, tal y como se explica en materiales y métodos. Se muestra **(A)** el aspecto del bazo de un ratón control. **(B)** Aspecto del bazo de un ratón tratado con NPR-TG donde no se observan cambios. **(C)** Bazo de un ratón tratado con NPR-TG donde se aprecian células compatibles con células de Kupffer con un contenido de material granular pigmentado de color negro. **(D)** Imagen a grandes aumentos de las células de Kupffer con el material negro. Escala 100 μm .

Únicamente en el bazo de un animal se ha observado un cambios reseñable en su estructura (figura 4.38). Se observa una lesión tipo necrótico con leve respuesta inflamatoria y gran infiltración linfocitaria (B). Así mismo el timo de este animal, presenta una hiperplasia de células linfocitarias que no tiene caracter tumoral (D) y una infiltración linfocitaria perivascular en el pulmón (C). Esto podría indicar infección, aunque en algunos casos se describen lesiones necróticas en bazo que no tienen una clara etiología bacteriana. Las NPs pueden alterar el sistema inmune [422] sin embargo al encontrarse solo en 1 ratón (de 9 ratones) no podemos atribuirlo a la inyección de los AuNPRs.

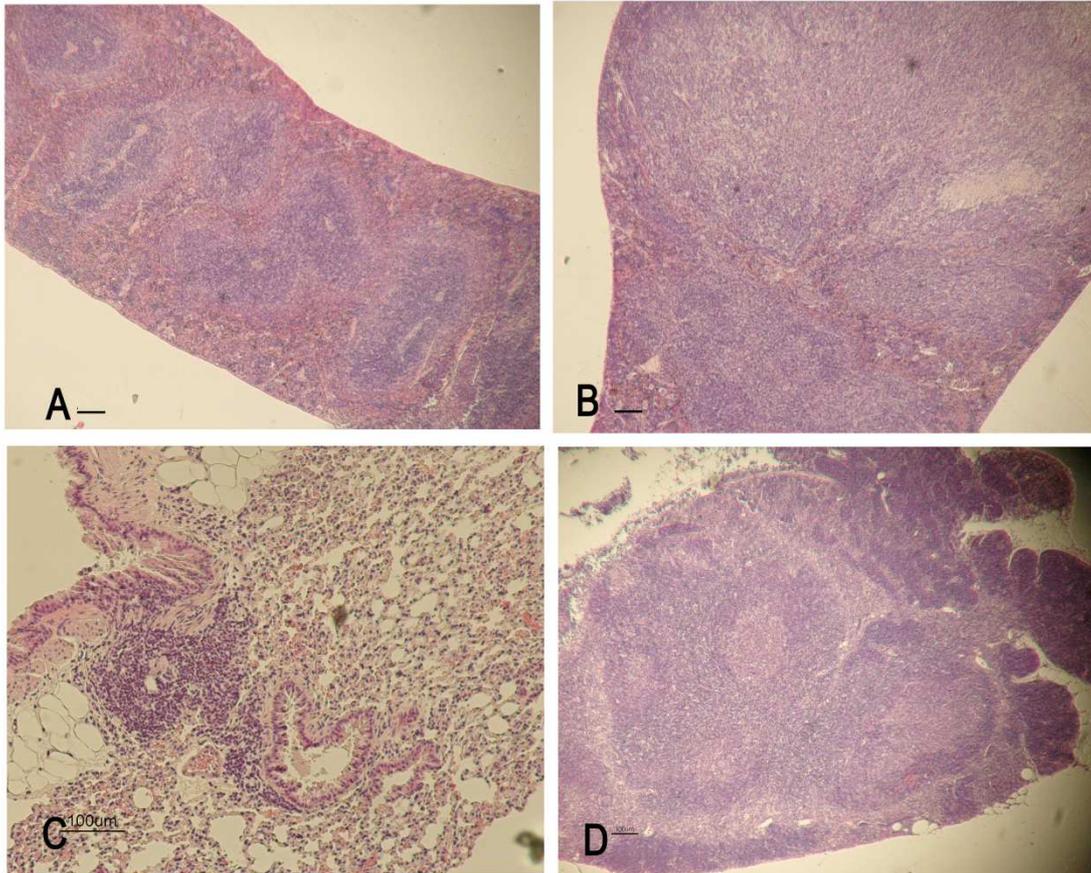


Figura 4.38: Lesión en bazo y timo de un ratón tratado con NPR-TG. (A) Bazo Control **(B)** Bazo de un ratón tratado donde se observa una formación multinodular que altera la arquitectura normal del bazo. **(C)** Infiltrados celulares en pulmón **(D)** Timo donde se observa una hiperplasia de células linfocitarias. Escala 100 μm .

Finalmente se analizaron 4 parámetros sanguíneos bioquímicos (creatinina, ALT, CK y LDH). Estos análisis se llevaron a cabo por el Dr. Sebastián Menao, en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

La creatinina es un producto de desecho que produce el metabolismo normal de los músculos, se elimina por orina por lo que es una forma muy común de evaluar el daño renal. La alanina aminotransferasa o ALT es una enzima aminotransferasa con alta concentración en el hígado, aunque también está presente en otros órganos como riñones, corazón y músculos. Cuando aparece elevada su concentración sanguínea se debe a que se ha producido daño en estos órganos. La LDH (Lactato deshidrogenasa) es una enzima que participa en el metabolismo energético anaeróbico. Se encuentra en numerosos tejidos, en mayor cantidad está presente en el músculo, corazón, hígado, riñones, cerebro, eritrocitos y pulmones. Cuando se produce la destrucción de estos tejidos pasa a sangre, por lo que indica daño en alguno de ellos. La CK o creatina quinasa, es una enzima que cataliza la reacción de fosforilación/defosforilación de la creatina, la fosfocreatina constituye una

reserva energética. Su fuga indica daño cerebral o cardiaco, también puede verse elevada por un exceso de ejercicio que produce daño muscular.

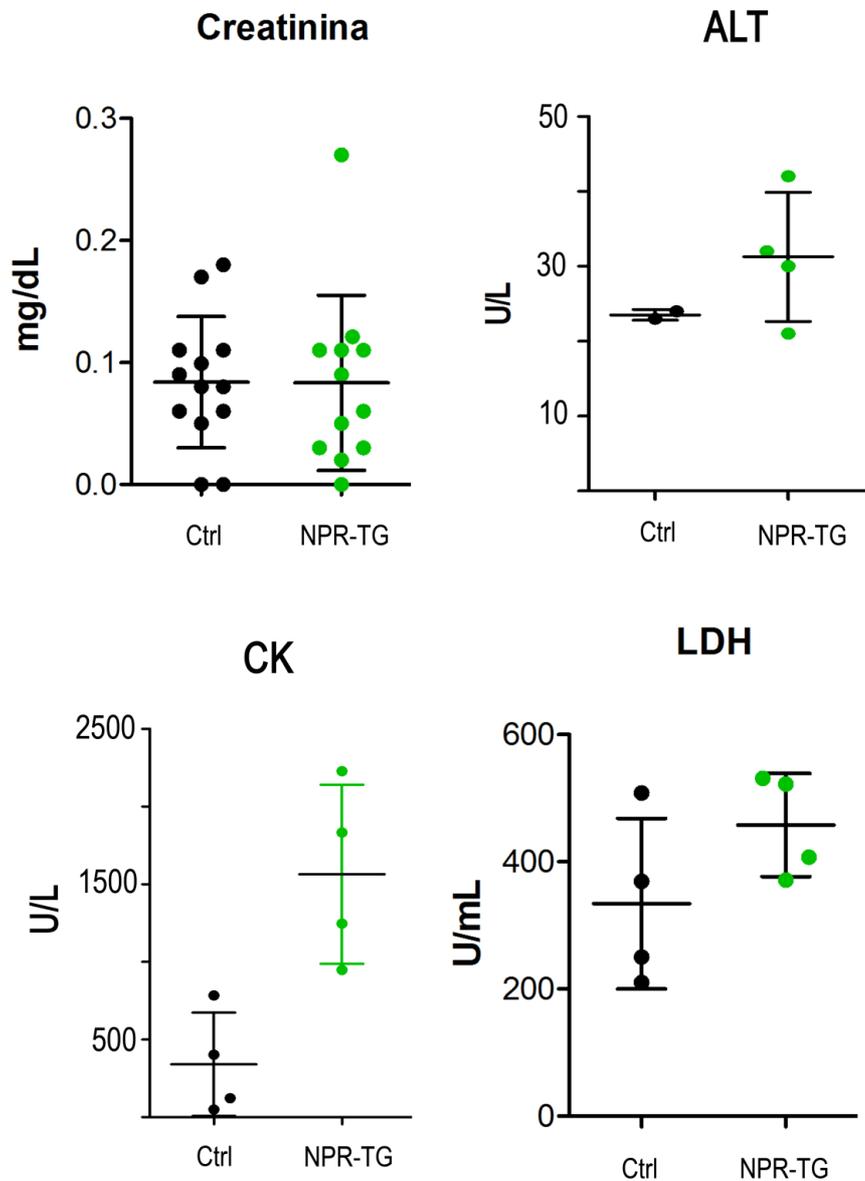


Figura 4.39: Análisis sanguíneos de ratones Swiss a los 4 meses de la inyección de NPR-TG. Se inyectaron 6 $\mu\text{g/g}$ de NPR-TG, se sacrificaron a los 4 meses y se extrajo sangre por punción intracardiaca. Se analizaron distintos parámetros sanguíneos **(A)** Creatinina. **(B)** Alaninotransferasa. **(C)** Creatinin kinasa. **(D)** Lactato deshidrogenasa. En la gráfica se representa la media \pm SEM.

Como se puede observar en la figura 4.39 la creatinina, ALT y LDH se encuentran dentro de los parámetros normales. Sin embargo, la CK aparece elevada en los ratones tratados con NPR-TG. Lo que indica daño muscular, ya sea cardiaco o esquelético. Los resultados histológicos no muestran daño cardiaco. El daño muscular está asociado a altos niveles de actividad y del

método de sacrificio, por lo que los valores normales dependen de cada estudio, sin embargo los valores de los ratones con daño muscular, como es el caso de ratones con distrofia muscular, aparecen por encima de 5000 U/L [440]. Además los resultados de LDH son normales, por lo que no consideramos esta elevación significativa ni indicativa de ningún daño.

4.5.3 Discusión

La farmacocinética y biodistribución son parámetros importantes a la hora de diseñar y testar nuevas NPs, ya que su efectividad depende de que alcancen el tejido diana y su toxicidad de si se acumulan en tejido sano. Sin embargo, muchos tipos de NPs inyectadas sistémicamente son rápidamente eliminadas de la circulación sanguínea por el sistema retículo endotelial (RES) y el sistema fagocítico mononuclear (MPS) principalmente a través del hígado y el bazo. Esto disminuye su índice terapéutico, ya que es necesario que las NPs permanezcan el tiempo suficiente en sangre para alcanzar el tejido diana. Sin embargo, las NPs que permanecen demasiado tiempo en sangre pueden presentar mayor toxicidad ya que podrían alcanzar mayor cantidad de tejidos. Por lo que es necesario un estudio de su farmacocinética, es decir, la absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Lo cual es primordial para poder comprender su comportamiento y diseñar las NPs de forma adecuada, sabiendo que aspectos modificar en su síntesis y funcionalización para obtener los resultados deseados.

La toxicidad de las AuNPs *in vivo* está relacionada con su tamaño, forma, superficie, dosis y vía de administración [441-443]. Está demostrado que el tamaño de las NPs juega un papel importante en su metabolismo. Las NPs pequeñas pueden ser eliminadas rápidamente por la orina [436], mientras que las mayores (100 nm) se acumulan en bazo e hígado [444]. Nuestros resultados muestran que los AuNPs se acumulan en hígado y bazo (figura 4.27 D y E), concretamente en células Kupffer o macrófagos lo que se puede observar incluso por histología (figuras 4.36 y 4.37) y queda confirmado por TEM y STEM (figura 4.30 y 4.31). Apoyando estos resultados, otros trabajos han observado una pigmentación oscura en las células Kupffer mediante HE [445] que se confirma como AuNPs mediante TEM. Se han detectado AuNPs en endosomas en el hígado y bazo [277], concretamente en lisosomas de las células Kupffer [444].

La acumulación de las NPs en bazo e hígado es principalmente debida a la opsonización de las NPs y la alta concentración de células fagocíticas residentes en estos órganos [446, 447]. La opsonización es un proceso por el cual un microorganismo o partícula extraña es recubierto por una serie de proteínas presentes en el suero sanguíneo llamadas opsoninas [448]. La unión o adsorción de estas proteínas en la superficie de las partículas permite su reconocimiento por parte de células fagocíticas y son de esta manera

fagocitadas y eliminadas rápidamente de la circulación sanguínea [449]. No hay métodos que eviten la completa opsonización de las NPs, sin embargo se puede ralentizar el proceso recubriendo las NPs con polímeros hidrofílicos o agentes no iónicos, aumentando su tiempo de vida en sangre [396], favoreciendo de esta forma que lleguen a más órganos. Entre los polímeros más utilizados hasta la fecha se encuentra el polietilenglicol (PEG) debido a que es hidrofílico, flexible y neutro. El recubrimiento con PEG aumenta el tiempo de vida en sangre de las NPs, lo que también depende de la longitud del polímero [434], sin embargo no evita que las NPs se acumulen en hígado y bazo [275, 434, 450, 451]. Esto puede deberse a la alta eficacia que el bazo presenta como filtro, y la alta presencia de macrófagos y capilares en el hígado [452].

Es interesante la observación por histología de un pigmento que podría corresponder a AuNPRs en una lesión en el pulmón de un ratón (figura 4.34), mientras que en el resto no se ha observado acumulación de oro en este órgano por ICP-MS (figura 4.27 D). A pesar de que la confirmación de que el material observado sea oro está pendiente, cabe destacar que las características de la vasculatura afectan a la extravasación de las NPs a los tejidos. Un factor determinante es la fisio-anatomía vascular [453], en algunos tejidos la extravasación de NPs es bastante eficiente ya que hay aperturas en los capilares, lo que ocurre en bazo e hígado. Así presentan una mayor permeabilidad, por lo que las NPs son extravasadas y quedan retenidas, un fenómeno que se conoce por EPR ("Enhance Permeation and Retention") [454-456], lo que permite la extravasación de partículas de más de 200 nm [275]. Estas aperturas en los capilares también se encuentran en los alrededores de los tumores, debido a la rápida creación de nuevo tejido vascular [457] y permiten el paso de moléculas de hasta 1 μm [458]. Sin embargo, el endotelio del pulmón, músculo y hueso está generalmente caracterizado por una morfología continua que permite la extravasación de partículas menores de 3 nm. El efecto EPR también se ha observado en procesos angiogénicos. La angiogénesis es un proceso importante en los desórdenes fibrovasculares como la reparación de heridas o artritis [459]. Por lo que es posible que las características de la lesión del pulmón hayan hecho posible la extravasación de los AuNPRs al pulmón en este caso concreto.

Por otro lado los capilares del glomérulo permiten la entrada de NPs hasta 100 nm sin embargo la lámina basal impide el paso de NPs de más de 5 nm [460]. Por ello se observa la eliminación de TAMRA por la orina en 24 h (figura 4.27) pero no de oro. Esto indica que el TAMRA se suelta del AuNPRs, lo que podría ocurrir por la ruptura del enlace S-Au que mantiene unido el PEG al AuNPR y así los AuNPRs desnudos son opsonizados y captados por los macrófagos del bazo e hígado. Sin embargo también se ha visto la acumulación en hígado y bazo de NPs de hierro (que tienen unido el PEG

mediante enlace covalente) [435]. El hígado es el principal órgano donde se acumulan las NPs, se ha observado acumulación de AuNPs en hígado incluso cuando son administradas intratraquealmente [461]. Algunos estudios han determinado que las NPs administradas por vía intravenosa se acumulan en bazo e hígado a largos tiempos, independientemente del tamaño, forma y material [322, 435, 444] y si están recubiertas o no de PEG [462], aunque la cantidad depende de estas características. Kreyling y colaboradores hicieron un estudio marcando radiactivamente el núcleo y la cubierta de AuNPs y observaron que el núcleo se acumulaba en hígado, mientras que fragmentos de la cubierta se eliminaban por el riñón. Con estos resultados propusieron que las AuNPs llegan al hígado donde la cubierta de PEG se suelta, ya que se observó parte de la cubierta marcada radiactivamente en el hígado [438]. Por todo ello suponemos que la distribución de los AuNPRs depende de muchos factores, entre los que se encuentran su tamaño y las características de los tejidos, no a que se pierda la cubierta de PEG.

Aunque con los resultados obtenidos no podemos determinar porque se suelta el TAMRA de los AuNPRs, existen dos opciones; que se rompa el enlace covalente que mantiene unido el fluoróforo a los AuNPRs a través del PEG o que sea el PEG el que se suelte. El PEG está unido a los AuNPRs a través de un enlace S-Au. La fortaleza del enlace S-Au depende de la geometría de la AuNP, el enlace es más fuerte en las AuNPs más compactas y con menor superficie [463] y es más débil en superficies planas [464], que sería el caso de los AuNPRs. La fortaleza del enlace S-Au varía también según la localización, en una misma NP los enlaces de los vértices y los laterales son más fuertes [465]. También depende de la accesibilidad al enlace S-Au de los grupos -SH de las moléculas que se encuentren en el medio, lo que depende del polímero, si es más o menos ramificado y los huecos que deja [466]. Por lo que existe la posibilidad de que se produzca un intercambio de grupos y se suelte el PEG de los AuNPRs debido a la ruptura del enlace S-Au. Por ello los métodos para unir covalentemente el PEG a las NPs son preferibles, ya que se minimiza la posibilidad de que el polímero se suelte [467] y con él, otras moléculas importantes para el funcionamiento de la NP. Con estos datos podríamos pensar que el enlace S-Au no sería el adecuado para unir el PEG a este tipo de AuNPs, ya que los AuNPRs presentan una gran superficie y por lo tanto el enlace S-Au es débil y más accesible, lo que favorece el intercambio de grupos y por lo tanto el desplazamiento del PEG [466]. Por ello es necesario llevar a cabo más estudios sobre la fortaleza de este enlace para determinar su efectividad en este tipo de NPs.

A pesar de que quedan varios detalles por determinar, lo que queda claro es la acumulación de AuNPRs en hígado y bazo a los 3 días de su administración, observándose una disminución en la cantidad de oro que se acumula en el hígado en 4 meses, lo que ya se ha observado en otros estudios [445].

Desafortunadamente, los AuNPRs no son biodegradables, por lo que su eliminación va a depender de su tamaño. Existen dos tipos de vías de eliminación, la renal y la hepato-biliar. Por orina se eliminan las NPs más pequeñas, mientras que las más grandes, que tienden a acumularse en el hígado, se eliminan por heces [434]. Aunque también se han observado NPs de pequeño tamaño, que se eliminan preferiblemente por heces [321]. Según la figura 4.29, los AuNPRs no se eliminan por orina, ya que no se observa oro en riñón, lo que no es de extrañar debido a su gran tamaño [436]. Por lo que podríamos pensar que se eliminan a través de las heces. Con los datos de ICP-MS de las heces recogidas durante los 3 primeros días, comprobaremos si es posible que estos AuNPRs, cuya cantidad en el hígado disminuye con el tiempo, pueden ser eliminados por el sistema hepato-biliar, como se ha visto que ocurre en otros trabajos [468]. Estos estudios demuestran que es posible la eliminación de las AuNPs del organismo aunque a una velocidad muy lenta [445].

Los resultados de determinación de cantidad de oro en los distintos órganos por ICP-MS muestran la acumulación del 30% de AuNPRs en hígado y bazo a los 3 días de su administración, pero no en los demás órganos analizados (pulmones, riñones, corazón, órganos reproductores y timo). Por lo que el 70% de los AuNPRs administrados a los 3 días de su administración pueden permanecer en sangre o haber sido eliminados por heces, lo que comprobaremos cuando tengamos los datos de ICP-MS. Las AuNPs también permanecen en sangre, aunque la cantidad y el tiempo dependen de su tamaño. Las más pequeñas se limpian más rápidamente, mientras que las más grandes aunque se encuentran en menor cantidad se limpian más despacio [444], además la cubierta de PEG aumenta el tiempo de vida en sangre [462].

La acumulación de NPs en los órganos puede resultar tóxica [469] o provocar efectos secundarios negativos como afectar al sistema inmune [451] si no son eliminadas [470]. El aumento de tamaño del riñón que se observa en los ratones inyectados con AuNPRs a los 3 días (figura 4.32 B), puede ser un efecto a corto plazo debido a la eliminación del TAMRA por orina, ya que con el tiempo vuelve a niveles normales, lo que ocurre en otros estudios en los que se observa daño renal a tiempos cortos que con el tiempo desaparece [471].

A pesar de la acumulación de los AuNPRs en hígado y bazo durante 4 meses, no se observan señales de toxicidad en cuanto a marcadores sanguíneos (figura 4.37) y otros aspectos como la ganancia de peso del ratón y el tamaño de los órganos (figura 4.32 y 4.34). Los primeros 3 días después del tratamiento los órganos parecen sanos y sin aparente daño tisular (figura 4.33). Sin embargo a los 4 meses si bien el bazo muestra un aspecto normal (figura 4.37) se puede observar un incremento en el tamaño del citoplasma de los hepatocitos (figura 4.36) que se hace más visible en la zona centrolobulillar.

Estos cambios son compatibles con una degeneración hidrónica o grasa, difícil de distinguirla de un acúmulo de glucógeno o fase inicial de lipidosis, que se han observado en otros trabajos en órganos con acúmulo de AuNPs [445]. Estos cambios serían indicadores de lesión hepática leve ya que no llegamos a apreciar necrosis, ni observamos respuesta inflamatoria y los niveles de ALT y LDH son normales (figura 4.39) mientras en otros estudios correlacionan el daño hepático con un aumento en los niveles de LDH [472]. La captación de NPs por parte de las células no siempre tiene efectos tóxicos y pequeños cambios en cuanto a una leve inflamación y ligera necrosis con baja incidencia se han considerado no adversos [445].

En el bazo no se observaron cambios reseñables en su estructura (figura 4.37 A y B), aunque la pulpa blanca se encuentra hipertrofiada moderadamente sin llegar a alterar la arquitectura del órgano. Estos mismos cambios ya se han observado en otros estudios considerándolos una respuesta biológica normal frente a la inyección de material externo que no es adversa [445].

Estos cambios leves observados en el bazo e hígado no se corresponden con un aumento en los niveles de marcadores toxicológicos sanguíneos como la ALT o LDH (figura 4.39). Aunque no deja de ser curioso que las medias de los ratones tratados con AuNPRs se encuentren por encima de los controles, aunque los valores estén dentro de los límites normales, lo que podría indicar que se producen ligeros cambios que no llegan a resultar dañinos.

Capítulo 5

Discusión general

La hipertermia suave (<43°C) es un reconocido adyuvante de la radioterapia y quimioterapia convencional [339], aunque esta estrategia no se ha adoptado ampliamente en la clínica por la dificultad de monitorizar la temperatura y por los métodos utilizados para producir calor. Los métodos convencionales aplican energía desde el exterior del cuerpo como ultrasonidos, bolsas de agua caliente, microondas, etc [473], de manera que el calor inducido es rápidamente disipado. Las AuNPs ofrecen una forma completamente diferente de provocar hipertermia utilizando sus propiedades fisico-químicas que les permiten transformar la energía de la luz absorbida en calor [265]. Además se pueden dirigir al tejido diana de forma que el aumento de temperatura se genere en el mismo tumor y el calor se disipe de dentro hacia fuera. Este hecho genera un mínimo calentamiento de los tejidos sanos ya que además, la longitud de onda de resonancia depende de la forma y tamaño de la AuNP [380], por lo que se puede localizar en el NIR donde no absorben los tejidos. Esta mejora en la técnica de calentamiento que ha permitido el desarrollo de la nanotecnología, hace que la terapia fototérmica (PTT) se pueda utilizar como terapia por sí sola para la eliminación de células tumorales mediante ablación térmica [7].

Los AuNPRs utilizados en esta tesis presentan una media de 150 nm de arista y 10 nm de grosor, así la banda de plasmón de resonancia de mayor contribución se localiza a 1080 nm. Estos AuNPRs presentan una alta eficiencia calorífica incluso a bajas concentraciones, al ser irradiados con un láser continuo a 1064 nm, induciendo muerte celular [31]. Estudios previos en la literatura indican la importancia de alcanzar un mínimo de temperatura para inducir la muerte de la célula [341] que nuestros resultados han marcado por encima de 50°C (figura 4.4 y 4.13 B). Utilizando estos AuNPRs se encontraron unas condiciones óptimas para inducir apoptosis en células MEF (2-4 min de irradiación a una potencia de 5 W/cm²) (figura 4.5 y 4.6) que además se lleva a cabo por la vía mitocondrial a través de la activación de Bid (figuras 4.7 - 4.8). Sin embargo, variando la potencia es posible inducir necrosis [31], lo cual puede ser interesante en los casos de tumores con mutaciones que les confieran resistencia a la apoptosis [388-389].

Las AuNPs han sido ampliamente estudiadas para su uso en PTT del cáncer. Sin embargo la determinación de su toxicidad también es importante, ya que buscamos una terapia segura y versátil. La nanotecnología se desarrolla en áreas donde las ventajas exceden los posibles riesgos como es el caso del tratamiento del cáncer. Se ha observado que los AuNPRs son internalizados en menor grado en células primarias lo que las hace más resistentes a la PTT (figura 4.12). Además, la acumulación de los AuNPRs en un tejido puede venir determinada por las características de la vasculatura [453], lo que favorece su extravasación en tumores y lesiones (figura 4.34) [457]. Sin embargo, también se acumulan en bazo e hígado (figuras 4.28 -

4.21) [446-447]. La acumulación de NPs en los órganos puede resultar tóxica [469], aunque nuestros AuNPRs, a pesar de que se acumulan en bazo e hígado (figuras 4.27, 4.30 y 4.31), no resultan tóxicos para estos órganos (figuras 4.32, 4.33, 4.34, 4.36, 4.37) lo que corrobora lo observado en otros trabajos [445]. Tampoco se ha observado toxicidad en los estudios *in vitro* (figuras 4.20 - 4.23) a pesar de que la presencia de AuNPRs produce un aumento moderado de los niveles de ROS (figuras 4.18 y 4.22) y caída de potencial de la membrana mitocondrial (figura 4.19) en las células. Estos cambios no siempre provocan la muerte de las células [402] ya que éstas tienen mecanismos para reducir los niveles de ROS y recuperar el potencial mitocondrial [267, 406-408]. Sin embargo, los efectos tóxicos de las NPs no solo implican los relacionados con la muerte de la célula sino que hay otras formas de toxicidad que alteran su función. Las AuNPs pueden provocar efectos secundarios negativos como afectar al sistema inmune [423, 424, 451]. Si bien la presencia de AuNPRs en la activación de las células NK no afecta a su viabilidad, sí que disminuye la proliferación celular (figura 4.26) y su actividad citotóxica (figura 4.25). De este modo la presencia de AuNPs podría suprimir la actividad del sistema inmune y generar efectos adversos para la terapia antitumoral como ya se ha sugerido previamente [38, 423]. Si un compuesto es inmunotóxico es muy probable que sea carcinógeno [474], por lo que es importante también analizar este aspecto para determinar la efectividad de la PTT.

Los resultados obtenidos indican que es posible inducir apoptosis mediante PTT utilizando AuNPRs y en caso necesario también es posible inducir necrosis. A su vez estos AuNPRs no parecen tóxicos ni en líneas celulares ni en ratones a pesar de su acumulación en bazo e hígado de forma crónica, aunque sí que ejercen un efecto sobre el sistema inmune disminuyendo la proliferación celular y la actividad citotóxica de las células NK *in vitro*. Aunque se desconoce la relevancia de esta interferencia, es un aspecto a tener en cuenta en estudios futuros. Estos resultados muestran que no es posible determinar el impacto de NPs en el organismo simplemente midiendo los efectos tóxicos sobre líneas celulares, esos análisis son muy restrictivos y no reflejan el efecto potencial de NPs en el organismo, sobre todo en caso de exposiciones largas. Además se tiene que tener en cuenta la posibilidad de que las NPs afecten a la función de las células lo que puede tener efectos no deseados en situaciones concretas y no sean detectados en los estudios convencionales, como por ejemplo en el caso de una infección.

Capítulo 6

Conclusiones

- Es necesario que se alcance una temperatura mínima, que se sitúa sobre los 50°C para que se produzca la muerte de la célula.
- El mecanismo de muerte celular depende de la intensidad de irradiación. Al irradiar a 5 W/cm² se induce apoptosis, mientras que si se irradia a 30 W/cm² las células mueren por necrosis.
- El tiempo de irradiación modula la extensión de muerte celular, ya que llega un momento que no se incrementa más la temperatura.
- El mecanismo de apoptosis activado con irradiaciones de 5 W/cm² depende de la vía intrínseca a través de la proteína Bid.
- Los AuNPRs son internalizados por las células, se localizan en lisosomas y tras la irradiación se liberan al citosol.
- Las células primarias internalizan menos AuNPRs, lo que puede deberse a un metabolismo más bajo.
- La glucosa favorece la internalización de los AuNPRs en las células transformadas y primarias.
- El grado de internalización de los AuNPRs depende de la línea celular y por lo tanto los posibles efectos sobre la célula dependerán de la línea celular seleccionada. Esto indica que para determinar realmente la toxicidad de las NPs es necesario utilizar tipos de células de distinto origen.
- La generación de ROS es prácticamente inherente al uso de NPs, pero no siempre resulta tóxica para la célula.
- La incubación de las células con AuNPRs produce caída de $\Delta\Psi_m$, pero no es suficiente para provocar la muerte de la célula.
- Los AuNPRs no afectan a la viabilidad celular ni en líneas celulares ni en células primarias (macrófagos y PBMCs) aunque sí disminuyen la proliferación celular e interfieren en la actividad citotóxica de las células NK.
- Los AuNPRs se acumulan en bazo e hígado.
- Parte de los AuNPRs acumulados en el hígado se eliminan en 4 meses, mientras que la cantidad acumulada en bazo permanece invariable.
- La acumulación de AuNPRs no altera la estructura del bazo.

Conclusiones

- La acumulación de AuNPRs modifica el tamaño de los hepatocitos, aumentando su volumen citoplasmático y el número de vacuolas, pero no produce daño hepático.
- La unión de TAMRA a los AuNPRs se rompe *in vivo* y el fluoróforo se elimina por orina en las primeras 24 h

Bibliografía

1. Lal S, Clare SE, Halas NJ. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: Impending clinical impact. *Accounts of chemical research* 41(12), 1842-1851 (2008).
2. Huschka R, Barhoumi A, Liu Q, Roth JA, Ji L, Halas NJ. Gene silencing by gold nanoshell-mediated delivery and laser-triggered release of antisense oligonucleotide and siRNA. *ACS nano* 6(9), 7681-7691 (2012).
3. Munoz Javier A, Del Pino P, Bedard MF *et al.* Photoactivated release of cargo from the cavity of polyelectrolyte capsules to the cytosol of cells. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24(21), 12517-12520 (2008).
4. Bao C, Beziere N, Del Pino P *et al.* Gold nanoprisms as optoacoustic signal nanoamplifiers for in vivo bioimaging of gastrointestinal cancers. *Small* 9(1), 68-74 (2013).
5. Baffou G, Bon P, Savatier J *et al.* Thermal imaging of nanostructures by quantitative optical phase analysis. *ACS nano* 6(3), 2452-2458 (2012).
6. Qin Z, Chan WC, Boulware DR, Akkin T, Butler EK, Bischof JC. Significantly improved analytical sensitivity of lateral flow immunoassays by using thermal contrast. *Angew Chem Int Ed Engl* 51(18), 4358-4361 (2012).
7. Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, Kang B, El-Sayed MA. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chemical Society reviews* 40(7), 3391-3404 (2011).
8. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology* 26(8), 425-433 (2008).
9. Polak JM, Varndell IM. *Immunolabelling for electron microscopy.*
10. Ostermann J, Schmidtke C, Wolter C, Merkl JP, Kloust H, Weller H. Tailoring the ligand shell for the control of cellular uptake and optical properties of nanocrystals. *Beilstein journal of nanotechnology* 6, 232-242 (2015).
11. Qin Z, Bischof JC. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating. *Chemical Society reviews* 41(3), 1191-1217 (2012).
12. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society reviews* 41(7), 2740-2779 (2012).
13. Rivera-Gil P, Jimenez De Aberasturi D, Wulf V *et al.* The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Accounts of chemical research* 46(3), 743-749 (2013).
14. Bartczak D, Muskens OL, Nitti S, Sanchez-Elsner T, Millar TM, Kanaras AG. Interactions of human endothelial cells with gold nanoparticles of different morphologies. *Small* 8(1), 122-130 (2012).
15. Mocan T, Matea CT, Cojocaru I *et al.* Photothermal treatment of human pancreatic cancer using pegylated multi-walled carbon nanotubes induces apoptosis by triggering

Bibliografía

- mitochondrial membrane depolarization mechanism. *Journal of Cancer* 5(8), 679-688 (2014).
16. Huang X, Kang B, Qian W *et al.* Comparative study of photothermolysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: Continuous wave or pulsed lasers. *Journal of biomedical optics* 15(5), 058002 (2010).
 17. Li JL, Gu M. Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells. *Biomaterials* 31(36), 9492-9498 (2010).
 18. Lowery AR, Gobin AM, Day ES, Halas NJ, West JL. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. *International journal of nanomedicine* 1(2), 149-154 (2006).
 19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6), 883-899 (2010).
 20. Obeid M, Panaretakis T, Joza N *et al.* Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and uvc light-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 14(10), 1848-1850 (2007).
 21. Groh V, Li YQ, Cioca D *et al.* Efficient cross-priming of tumor antigen-specific t cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-mica opsonized tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(18), 6461-6466 (2005).
 22. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35(4), 495-516 (2007).
 23. Yuan H, Fales AM, Vo-Dinh T. Tat peptide-functionalized gold nanostars: Enhanced intracellular delivery and efficient nir photothermal therapy using ultralow irradiance. *Journal of the American Chemical Society* 134(28), 11358-11361 (2012).
 24. Moros M, Hernaez B, Garet E *et al.* Monosaccharides versus peg-functionalized nps: Influence in the cellular uptake. *ACS nano* 6(2), 1565-1577 (2012).
 25. Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (bbb). *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 71(2), 251-256 (2009).
 26. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761), 622-627 (2006).
 27. Huhn D, Kantner K, Geidel C *et al.* Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS nano* 7(4), 3253-3263 (2013).
 28. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano today* 6, 446-465 (2011).

29. Xia T, Kovochich M, Liong M, Zink JI, Nel AE. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS nano* 2(1), 85-96 (2008).
30. Soenen SJ, Manshian B, Montenegro JM *et al.* Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS nano* 6(7), 5767-5783 (2012).
31. Pelaz B, Grazu V, Ibarra A, Magen C, Del Pino P, De La Fuente JM. Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28(24), 8965-8970 (2012).
32. Polo E, Del Pino P, Pelaz B, Grazu V, De La Fuente JM. Plasmonic-driven thermal sensing: Ultralow detection of cancer markers. *Chem Commun (Camb)* 49(35), 3676-3678 (2013).
33. Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano letters* 5(4), 709-711 (2005).
34. Huff TB, Tong L, Zhao Y, Hansen MN, Cheng JX, Wei A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine (Lond)* 2(1), 125-132 (2007).
35. Singh A, Wu H, Zhang P, Happel C, Ma J, Biswal S. Expression of abcg2 (bcrp) is regulated by nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Molecular cancer therapeutics* 9(8), 2365-2376 (2010).
36. Nel AE, Madler L, Velegol D *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8(7), 543-557 (2009).
37. Li J, Chang X, Chen X *et al.* Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnology advances* 32(4), 727-743 (2014).
38. Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villiers MB, Marche P. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology* 12(1), 55-60 (2010).
39. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT *et al.* Ifngamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832), 1107-1111 (2001).
40. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P *et al.* Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell death and differentiation* 16(1), 3-11 (2009).
41. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11(13), 1050-1062 (2009).
42. Penalzoza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in development: Shaping the embryo. *Histochemistry and cell biology* 126(2), 149-158 (2006).
43. Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 279(4), 300-307 (1998).

Bibliografía

44. Twu C, Liu NQ, Popik W *et al.* Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptor-controlled pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22), 14386-14391 (2002).
45. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England journal of medicine* 348(14), 1365-1375 (2003).
46. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26(4), 239-257 (1972).
47. Krysko DV, Vandenabeele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell death and differentiation* 15(1), 29-38 (2008).
48. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews. Immunology* 8(1), 59-73 (2008).
49. [Http://www.assay-protocol.com/cell-biology/apoptosis](http://www.assay-protocol.com/cell-biology/apoptosis).
50. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805), 770-776 (2000).
51. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW *et al.* Human ice/ced-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2), 171 (1996).
52. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. *Trends in biochemical sciences* 22(8), 299-306 (1997).
53. Iwata A, Nishio K, Winn RK, Chi EY, Henderson WR, Jr., Harlan JM. A broad-spectrum caspase inhibitor attenuates allergic airway inflammation in murine asthma model. *J Immunol* 170(6), 3386-3391 (2003).
54. Catalán E. Análisis de la contribución de los mecanismos efectoros de las células citotóxicas en la inmunidad antitumoral. *Bioquímica y Biología Molecular y Celular*, 231 (2013).
55. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64(4), 821-846 (2000).
56. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6(11), 1028-1042 (1999).
57. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 151(1), 10-27 (2008).
58. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* 9(2), 423-432 (2002).
59. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20), 10964-10967 (1999).

60. Sintsov AV, Kovalenko EI, Khanin MA. [apoptosis induced by granzyme b]. *Biorganicheskaja khimiia* 34(6), 725-733 (2008).
61. Luthi AU, Martin SJ. The casbah: A searchable database of caspase substrates. *Cell death and differentiation* 14(4), 641-650 (2007).
62. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 22(53), 8543-8567 (2003).
63. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of cad inhibitor in cad activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662), 96-99 (1998).
64. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of rock i. *Nature cell biology* 3(4), 339-345 (2001).
65. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of rock i induces mlc phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology* 3(4), 346-352 (2001).
66. Lauber K, Bohn E, Krober SM *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113(6), 717-730 (2003).
67. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA *et al.* Identification and inhibition of the ice/ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535), 37-43 (1995).
68. Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ice-like protease in fas-mediated apoptosis. *Nature* 375(6526), 78-81 (1995).
69. Deveraux QL, Reed JC. Iap family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 13(3), 239-252 (1999).
70. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked iap is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388(6639), 300-304 (1997).
71. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein xiap results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO journal* 18(19), 5242-5251 (1999).
72. Roy N, Mahadevan MS, Mclean M *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80(1), 167-178 (1995).
73. Tamm I, Wang Y, Sausville E *et al.* Iap-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by fas (cd95), bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research* 58(23), 5315-5320 (1998).
74. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine* 3(8), 917-921 (1997).
75. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *The Journal of biological chemistry* 273(18), 11177-11182 (1998).

Bibliografía

76. Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y. Regulation of trail-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitamins and hormones* 67, 453-483 (2004).
77. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 273(49), 32608-32613 (1998).
78. Youle RJ, Strasser A. The bcl-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(1), 47-59 (2008).
79. Shore GC, Nguyen M. Bcl-2 proteins and apoptosis: Choose your partner. *Cell* 135(6), 1004-1006 (2008).
80. Aguiló JI. Mecanismos efectores y de activación de linfocitos t citotoxicos y células nk. (2009).
81. Correia C, Lee SH, Meng XW *et al.* Emerging understanding of bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochimica et biophysica acta* 1853(7), 1658-1671 (2015).
82. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. Bh3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1813(4), 508-520 (2011).
83. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC *et al.* Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by bcl-2 subfamilies. *Nature cell biology* 8(12), 1348-1358 (2006).
84. Fletcher JI, Meusburger S, Hawkins CJ *et al.* Apoptosis is triggered when prosurvival bcl-2 proteins cannot restrain bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(47), 18081-18087 (2008).
85. Vela L, Gonzalo O, Naval J, Marzo I. Direct interaction of bax and bak proteins with bcl-2 homology domain 3 (bh3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *The Journal of biological chemistry* 288(7), 4935-4946 (2013).
86. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* 139(5), 1281-1292 (1997).
87. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G *et al.* Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111(3), 331-342 (2002).
88. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87(1), 99-163 (2007).
89. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684), 626-629 (2004).
90. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports* 41(1), 11-22 (2008).

91. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I *et al.* Cytochrome c and datp-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4), 479-489 (1997).
92. Lacasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. Iap-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27(48), 6252-6275 (2008).
93. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating iap inhibition. *Cell* 102(1), 33-42 (2000).
94. Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (aif): Caspase-independent after all. *Cell death and differentiation* 11(6), 591-595 (2004).
95. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718), 441-446 (1999).
96. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease g is an apoptotic dnase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842), 95-99 (2001).
97. Dash P. Nitric oxide research group.
98. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K *et al.* A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell* 2(1), 55-67 (2002).
99. Raemy E, Martinou JC. Involvement of cardiolipin in tBid-induced activation of bax during apoptosis. *Chemistry and physics of lipids* 179, 70-74 (2014).
100. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates bid, which oligomerizes bak or bax into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* 7(12), 1166-1173 (2000).
101. Kluck RM, Esposito MD, Perkins G *et al.* The pro-apoptotic proteins, bid and bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *The Journal of cell biology* 147(4), 809-822 (1999).
102. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of smac/diablo from mitochondria requires active caspases and is blocked by bcl-2. *The EMBO journal* 20(23), 6627-6636 (2001).
103. Petronilli V, Miotto G, Canton M *et al.* Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophysical journal* 76(2), 725-734 (1999).
104. Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25(34), 4744-4756 (2006).
105. Chang LK, Schmidt RE, Johnson EM, Jr. Alternating metabolic pathways in ngf-deprived sympathetic neurons affect caspase-independent death. *The Journal of cell biology* 162(2), 245-256 (2003).

Bibliografía

106. Von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD. Preservation of mitochondrial structure and function after bid- or bax-mediated cytochrome c release. *The Journal of cell biology* 150(5), 1027-1036 (2000).
107. Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P *et al.* Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex i of the electron transport chain. *Cell* 117(6), 773-786 (2004).
108. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The tnf and tnf receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104(4), 487-501 (2001).
109. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281(5381), 1305-1308 (1998).
110. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I *et al.* Cytotoxicity-dependent apo-1 (fas/cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (disc) with the receptor. *The EMBO journal* 14(22), 5579-5588 (1995).
111. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* 273(5), 2926-2930 (1998).
112. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in cd95 type i and type ii cells. *The Journal of biological chemistry* 274(32), 22532-22538 (1999).
113. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A *et al.* Two cd95 (apo-1/fas) signaling pathways. *The EMBO journal* 17(6), 1675-1687 (1998).
114. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4), 481-490 (1998).
115. Medema JP, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME. Bcl-xl acts downstream of caspase-8 activation by the cd95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 273(6), 3388-3393 (1998).
116. Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P. T cell receptor-induced fas ligand expression in cytotoxic t lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin a. *European journal of immunology* 24(10), 2469-2476 (1994).
117. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S *et al.* Activated human t cells release bioactive fas ligand and apo2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163(3), 1274-1281 (1999).
118. He JS, Ostergaard HL. Ctl's contain and use intracellular stores of fasl distinct from cytolytic granules. *J Immunol* 179(4), 2339-2348 (2007).
119. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine t-cell suicide mediated by apo-1/(fas/cd95). *Nature* 373(6513), 438-441 (1995).

120. Bosque A, Aguilo JI, Del Rey M *et al.* Cell cycle regulation by fasl and apo2l/trail in human t-cell blasts. Implications for autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Journal of leukocyte biology* 84(2), 488-498 (2008).
121. O'donnell MA, Ting AT. Nfkappab and ubiquitination: Partners in disarming ripk1-mediated cell death. *Immunologic research* 54(1-3), 214-226 (2012).
122. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: Tnf receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12(1), 1-9 (1996).
123. Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B *et al.* Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the tnfr1 signaling complex and is required for tnf-mediated gene induction. *Molecular cell* 36(5), 831-844 (2009).
124. Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC *et al.* Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* 471(7340), 591-596 (2011).
125. Wang L, Du F, Wang X. Tnf-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133(4), 693-703 (2008).
126. O'donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A *et al.* Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing cyld. *Nature cell biology* 13(12), 1437-1442 (2011).
127. Pan G, O'rourke K, Chinnaiyan AM *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand trail. *Science* 276(5309), 111-113 (1997).
128. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM *et al.* Control of trail-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277(5327), 818-821 (1997).
129. Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by apo2 ligand. *Recent progress in hormone research* 54, 225-234 (1999).
130. Martinez-Lostao L, Marzo I, Anel A, Naval J. Targeting the apo2l/trail system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochemical pharmacology* 83(11), 1475-1483 (2012).
131. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M *et al.* Expression and function of tnfr-related apoptosis-inducing ligand on murine activated nk cells. *J Immunol* 163(4), 1906-1913 (1999).
132. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail). *The Journal of experimental medicine* 190(8), 1155-1164 (1999).
133. Martinez-Lorenzo MJ, Alava MA, Gamen S *et al.* Involvement of apo2 ligand/trail in activation-induced death of jurkat and human peripheral blood t cells. *European journal of immunology* 28(9), 2714-2725 (1998).
134. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound trail in human t cells, b cells, and monocytes. *Cytokine* 24(6), 244-253 (2003).

Bibliografía

135. Bosque A, Pardo J, Martinez-Lorenzo MJ *et al.* Down-regulation of normal human t cell blast activation: Roles of apo2l/trail, fasl, and c- flip, bim, or bcl-x isoform expression. *Journal of leukocyte biology* 77(4), 568-578 (2005).
136. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. Trail signalling: Decisions between life and death. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(7-8), 1462-1475 (2007).
137. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in trail/dr5-dependent suppression induced by cd4(+)cd25(+) regulatory t cells. *Cell death and differentiation* 14(12), 2076-2084 (2007).
138. Garcia KC, Degano M, Pease LR *et al.* Structural basis of plasticity in t cell receptor recognition of a self peptide-mhc antigen. *Science* 279(5354), 1166-1172 (1998).
139. Lanier LL. Nk cell recognition. *Annual review of immunology* 23, 225-274 (2005).
140. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (rae-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a mhc class i-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20), 11521-11526 (2001).
141. Ortaldo JR, Young HA. Expression of ifn-gamma upon triggering of activating ly49d nk receptors in vitro and in vivo: Costimulation with il-12 or il-18 overrides inhibitory receptors. *J Immunol* 170(4), 1763-1769 (2003).
142. Bossi G, Griffiths GM. Ctl secretory lysosomes: Biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in immunology* 17(1), 87-94 (2005).
143. Pardo J, Aguilo JI, Anel A *et al.* The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: Granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11(4), 452-459 (2009).
144. Arias MA, Jimenez De Bagues MP, Aguilo N *et al.* Elucidating sources and roles of granzymes a and b during bacterial infection and sepsis. *Cell reports* 8(2), 420-429 (2014).
145. Masson D, Tschopp J. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic t-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 260(16), 9069-9072 (1985).
146. Idone V, Tam C, Andrews NW. Two-way traffic on the road to plasma membrane repair. *Trends in cell biology* 18(11), 552-559 (2008).
147. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological reviews* 235(1), 35-54 (2010).
148. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology* 15(6), 388-400 (2015).
149. Mcguire MJ, Lipsky PE, Thiele DL. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase i. *The Journal of biological chemistry* 268(4), 2458-2467 (1993).

150. Trapani JA. Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome biology* 2(12), REVIEWS3014 (2001).
151. Mullbacher A, Waring P, Tha Hla R *et al.* Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24), 13950-13955 (1999).
152. Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *European journal of immunology* 32(10), 2881-2887 (2002).
153. Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the ctl/nk protease granzyme b. *Immunological reviews* 235(1), 105-116 (2010).
154. Pardo J, Galvez EM, Koskinen A *et al.* Caspase-dependent inhibition of mousepox replication by gzmb. *PLoS one* 4(10), e7512 (2009).
155. Hendel A, Hiebert PR, Boivin WA, Williams SJ, Granville DJ. Granzymes in age-related cardiovascular and pulmonary diseases. *Cell death and differentiation* 17(4), 596-606 (2010).
156. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: Granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology* 26, 389-420 (2008).
157. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme b in injury, inflammation, and repair. *Trends in molecular medicine* 18(12), 732-741 (2012).
158. Pardo J, Wallich R, Martin P *et al.* Granzyme b-induced cell death exerted by ex vivo ctl: Discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell death and differentiation* 15(3), 567-579 (2008).
159. Waugh SM, Harris JL, Fletterick R, Craik CS. The structure of the pro-apoptotic protease granzyme b reveals the molecular determinants of its specificity. *Nature structural biology* 7(9), 762-765 (2000).
160. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML *et al.* Granzyme b activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of cell biology* 160(6), 875-885 (2003).
161. Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. Granzyme b induces bid-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry* 276(10), 6974-6982 (2001).
162. Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *Journal of leukocyte biology* 87(2), 237-243 (2010).
163. Casciola-Rosen L, Garcia-Calvo M, Bull HG *et al.* Mouse and human granzyme b have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. *The Journal of biological chemistry* 282(7), 4545-4552 (2007).

Bibliografía

164. Kaiserman D, Bird CH, Sun J *et al.* The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of cell biology* 175(4), 619-630 (2006).
165. Cullen SP, Adrain C, Luthi AU, Duriez PJ, Martin SJ. Human and murine granzyme b exhibit divergent substrate preferences. *The Journal of cell biology* 176(4), 435-444 (2007).
166. Catalan E, Jaime-Sanchez P, Aguilo N, Simon MM, Froelich CJ, Pardo J. Mouse cytotoxic t cell-derived granzyme b activates the mitochondrial cell death pathway in a bim-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry* 290(11), 6868-6877 (2015).
167. Aguilo JI, Anel A, Catalan E *et al.* Granzyme b of cytotoxic t cells induces extramitochondrial reactive oxygen species production via caspase-dependent nadph oxidase activation. *Immunology and cell biology* 88(5), 545-554 (2010).
168. Adrain C, Duriez PJ, Brumatti G, Delivani P, Martin SJ. The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme b, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *The Journal of biological chemistry* 281(12), 8118-8125 (2006).
169. Browne KA, Johnstone RW, Jans DA, Trapani JA. Filamin (280-kda actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic t lymphocyte protease granzyme b during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 275(50), 39262-39266 (2000).
170. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. Dff45/icad can be directly processed by granzyme b during the induction of apoptosis. *Immunity* 12(6), 621-632 (2000).
171. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P *et al.* Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, 1463-1467 (2005).
172. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: Role of proteases. *J Immunol* 166(11), 6847-6854 (2001).
173. Vanden Berghe T, Kalai M, Denecker G, Meeus A, Saelens X, Vandenabeele P. Necrosis is associated with il-6 production but apoptosis is not. *Cellular signalling* 18(3), 328-335 (2006).
174. Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Annals of emergency medicine* 36(5), 483-506 (2000).
175. Degtarev A, Huang Z, Boyce M *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* 1(2), 112-119 (2005).
176. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine* 8(3), 207-220 (2008).

177. Zhang DW, Shao J, Lin J *et al.* Rip3, an energy metabolism regulator that switches tnf-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325(5938), 332-336 (2009).
178. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell death and differentiation* 19(1), 107-120 (2012).
179. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(10), 700-714 (2010).
180. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current biology : CB* 9(17), 967-970 (1999).
181. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et biophysica acta* 1757(9-10), 1371-1387 (2006).
182. Holler N, Zaru R, Micheau O *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase rip as effector molecule. *Nature immunology* 1(6), 489-495 (2000).
183. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38(2), 209-223 (2013).
184. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews. Cancer* 5(11), 886-897 (2005).
185. Dunn WA, Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in cell biology* 4(4), 139-143 (1994).
186. Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba dictyostelium discoideum. *The Journal of biological chemistry* 278(20), 17636-17645 (2003).
187. Yang Z, Goronzy JJ, Weyand CM. Autophagy in autoimmune disease. *J Mol Med (Berl)*, (2015).
188. Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy*, 0 (2015).
189. Lum JJ, Bauer DE, Kong M *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120(2), 237-248 (2005).
190. Wu YT, Tan HL, Huang Q *et al.* Autophagy plays a protective role during zvad-induced necrotic cell death. *Autophagy* 4(4), 457-466 (2008).
191. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: An innocent convict? *The Journal of clinical investigation* 115(10), 2679-2688 (2005).

Bibliografía

192. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N *et al.* Role of bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology* 6(12), 1221-1228 (2004).
193. Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E *et al.* Bh3-only proteins and bh3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between beclin 1 and bcl-2/bcl-x(l). *Autophagy* 3(4), 374-376 (2007).
194. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A *et al.* Functional and physical interaction between bcl-x(l) and a bh3-like domain in beclin-1. *The EMBO journal* 26(10), 2527-2539 (2007).
195. Clarke PG. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology* 181(3), 195-213 (1990).
196. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC *et al.* Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 445, 29-76 (2008).
197. Schmelzle T, Hall MN. Tor, a central controller of cell growth. *Cell* 103(2), 253-262 (2000).
198. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry* 273(7), 3963-3966 (1998).
199. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic cell* 1(1), 11-21 (2002).
200. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15(7), 713-720 (2013).
201. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. Jnk1-mediated phosphorylation of bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell* 30(6), 678-688 (2008).
202. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 90(4), 1383-1435 (2010).
203. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 9(3-4), 65-76 (2003).
204. Labbe K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell death and differentiation* 15(9), 1339-1349 (2008).
205. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular microbiology* 38(1), 31-40 (2000).
206. Van Der Velden AW, Velasquez M, Starnbach MN. Salmonella rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* 171(12), 6742-6749 (2003).
207. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P *et al.* Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7(12), 2350-2363 (2008).
208. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M. The inflammatory caspases: Key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* 177(7), 4239-4245 (2006).

209. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372), 768-774 (1992).
210. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: Two cytokine substrates for ice (caspase-1). *Journal of clinical immunology* 19(1), 1-11 (1999).
211. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology* 9(3), 113-114 (2001).
212. He Y, Amer AO. Microbial modulation of host apoptosis and pyroptosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, 83 (2014).
213. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* 7(2), 99-109 (2009).
214. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science* 23, 22-36 (1960).
215. Binnig GR, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters* 49, 57-61 (1982).
216. Kroto HWH, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* 318, 162-163 (1985).
217. El-Sayed MA. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts of chemical research* 34(4), 257-264 (2001).
218. Whitesides GM. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature biotechnology* 21(10), 1161-1165 (2003).
219. De La Fuente JM, Penades S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochimica et biophysica acta* 1760(4), 636-651 (2006).
220. Tsuzuki T. Commercial scale production of inorganic nanoparticles *International Journal Nanotechnology* 6, 567-578 (2009).
221. Goesmann H, Feldmann C. Nanoparticulate functional materials. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(8), 1362-1395 (2010).
222. Murphy CJ, Sau TK, Gole AM *et al.* Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *The journal of physical chemistry. B* 109(29), 13857-13870 (2005).
223. Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society reviews* 41(11), 4306-4334 (2012).
224. Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 368(1915), 1333-1383 (2010).

Bibliografía

225. Rousset A. Specific electrical, magnetic, and magneto-optical properties of materials manufactured by 'chimie deuce'. *Solid State Ionics* 84, 293-301 (1996).
226. Langille MR, Personick ML, Zhang J, Mirkin CA. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 134(35), 14542-14554 (2012).
227. Sapsford KE, Algar WR, Berti L *et al.* Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical reviews* 113(3), 1904-2074 (2013).
228. Kim K, Kim JH, Park H *et al.* Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 146(2), 219-227 (2010).
229. West JL, Halas NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology commentary. *Current opinion in biotechnology* 11(2), 215-217 (2000).
230. Huang T, Nallathamby PD, Gillet D, Xu XH. Design and synthesis of single-nanoparticle optical biosensors for imaging and characterization of single receptor molecules on single living cells. *Analytical chemistry* 79(20), 7708-7718 (2007).
231. Giljohann DA, Mirkin CA. Drivers of biodiagnostic development. *Nature* 462(7272), 461-464 (2009).
232. Stoeva SI, Lee JS, Smith JE, Rosen ST, Mirkin CA. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcode nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society* 128(26), 8378-8379 (2006).
233. Sheng Y, Liao LD, Thakor NV, Tan MC. Nanoparticles for molecular imaging. *Journal of biomedical nanotechnology* 10(10), 2641-2676 (2014).
234. Antonelli A, Magnani M. Red blood cells as carriers of iron oxide-based contrast agents for diagnostic applications. *Journal of biomedical nanotechnology* 10(9), 1732-1750 (2014).
235. Domey J, Teichgraber U, Hilger I. Gold nanoparticles allow detection of early-stage edema in mice via computed tomography imaging. *International journal of nanomedicine* 10, 3803-3814 (2015).
236. Wu Q, Chen L, Huang L *et al.* Quantum dots decorated gold nanorod as fluorescent-plasmonic dual-modal contrasts agent for cancer imaging. *Biosensors & bioelectronics* 74, 16-23 (2015).
237. Uthaman S, Lee SJ, Cherukula K, Cho CS, Park IK. Polysaccharide-coated magnetic nanoparticles for imaging and gene therapy. *BioMed research international* 2015, 959175 (2015).
238. Jain A, Garg NK, Tyagi RK *et al.* Surface engineered polymeric nanocarriers mediate the delivery of transferrin-methotrexate conjugates for an improved understanding of brain cancer. *Acta biomaterialia*, (2015).

239. Moros M, Ambrosone A, Stepien G *et al.* Deciphering intracellular events triggered by mild magnetic hyperthermia in vitro and in vivo. *Nanomedicine (Lond)*, 1-17 (2015).
240. Perez-Hernandez M, Del Pino P, Mitchell SG *et al.* Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS nano* 9(1), 52-61 (2015).
241. Souza JG, Dias K, Pereira TA, Bernardi DS, Lopez RF. Topical delivery of ocular therapeutics: Carrier systems and physical methods. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 66(4), 507-530 (2014).
242. Kim TY, Kim DW, Chung JY *et al.* Phase i and pharmacokinetic study of genexol-pm, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(11), 3708-3716 (2004).
243. Matsumura Y, Hamaguchi T, Ura T *et al.* Phase i clinical trial and pharmacokinetic evaluation of nk911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *British journal of cancer* 91(10), 1775-1781 (2004).
244. Gong J, Chen M, Zheng Y, Wang S, Wang Y. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 159(3), 312-323 (2012).
245. Seymour LW, Ferry DR, Kerr DJ *et al.* Phase ii studies of polymer-doxorubicin (pk1, fce28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *International journal of oncology* 34(6), 1629-1636 (2009).
246. Li C. Poly(l-glutamic acid)--anticancer drug conjugates. *Advanced drug delivery reviews* 54(5), 695-713 (2002).
247. Sabbatini P, Aghajanian C, Dizon D *et al.* Phase ii study of ct-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(22), 4523-4531 (2004).
248. Langer CJ, O'byrne KJ, Socinski MA *et al.* Phase iii trial comparing paclitaxel poliglumex (ct-2103, ppx) in combination with carboplatin versus standard paclitaxel and carboplatin in the treatment of ps 2 patients with chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3(6), 623-630 (2008).
249. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the epr effect. *Advanced drug delivery reviews* 63(3), 131-135 (2011).
250. Palui G, Aldeek F, Wang W, Mattoussi H. Strategies for interfacing inorganic nanocrystals with biological systems based on polymer-coating. *Chemical Society reviews* 44(1), 193-227 (2015).
251. Ahn HK, Jung M, Sym SJ *et al.* A phase ii trial of cremophor el-free paclitaxel (genexol-pm) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 74(2), 277-282 (2014).

Bibliografía

252. Mccarthy TD, Karellas P, Henderson SA *et al.* Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for hiv and sti prevention. *Molecular pharmaceutics* 2(4), 312-318 (2005).
253. Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anti-cancer drugs* 16(7), 691-707 (2005).
254. Gabizon A, Catane R, Uziely B *et al.* Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer research* 54(4), 987-992 (1994).
255. De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Anel A, Martinez-Lostao L. Liposome-bound trail induces superior dr5 clustering and enhanced disc recruitment in histiocytic lymphoma u937 cells. *Leukemia research* 39(6), 657-666 (2015).
256. De Miguel D, Basanez G, Sanchez D *et al.* Liposomes decorated with apo2l/trail overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells. *Molecular pharmaceutics* 10(3), 893-904 (2013).
257. Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances. *Therapeutic advances in vaccines* 2(6), 159-182 (2014).
258. Fang RH, Luk BT, Hu CM, Zhang L. Engineered nanoparticles mimicking cell membranes for toxin neutralization. *Advanced drug delivery reviews*, (2015).
259. Rojas-Chapana J, Troszczyńska J, Firkowska I, Morszeck C, Giersig M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into escherichia coli cells. *Lab on a chip* 5(5), 536-539 (2005).
260. Chen D, Dougherty CA, Zhu K, Hong H. Theranostic applications of carbon nanomaterials in cancer: Focus on imaging and cargo delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 210, 230-245 (2015).
261. Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281(5385), 2013-2016 (1998).
262. Galvez E, Duser M, Borsch M, Wrachtrup J, Graber P. Quantum dots for single-pair fluorescence resonance energy transfer in membrane- integrated efof1. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 5), 1017-1021 (2008).
263. Scherer F, Anton M, Schillinger U *et al.* Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene therapy* 9(2), 102-109 (2002).
264. Maalej NM, Qurashi A, Assadi AA *et al.* Synthesis of gd2o3:Eu nanoplatelets for mri and fluorescence imaging. *Nanoscale research letters* 10, 215 (2015).
265. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of chemical research* 41(12), 1578-1586 (2008).
266. Ao L, Gao F, Pan B, He R, Cui D. Fluoroimmunoassay for antigen based on fluorescence quenching signal of gold nanoparticles. *Analytical chemistry* 78(4), 1104-1106 (2006).

267. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA *et al.* Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano letters* 10(7), 2543-2548 (2010).
268. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(5), 1310-1316 (2008).
269. Karimi Z, Karimi L, Shokrollahi H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 33(5), 2465-2475 (2013).
270. Qhobosheane M, Santra S, Zhang P, Tan W. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *The Analyst* 126(8), 1274-1278 (2001).
271. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 57(1), 35-52 (2004).
272. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (spions): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* 63(1-2), 24-46 (2011).
273. Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. Pegylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced drug delivery reviews* 55(3), 403-419 (2003).
274. Gao H, He Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. *Expert opinion on drug delivery* 11(3), 409-420 (2014).
275. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 307(1), 93-102 (2006).
276. De La Fuente JM, Berry CC. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjugate chemistry* 16(5), 1176-1180 (2005).
277. Tiwari PM, Eroglu E, Bawage SS *et al.* Enhanced intracellular translocation and biodistribution of gold nanoparticles functionalized with a cell-penetrating peptide (vg-21) from vesicular stomatitis virus. *Biomaterials* 35(35), 9484-9494 (2014).
278. Li L, Gao F, Jiang W *et al.* Folic acid-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeting mr imaging. *Drug delivery*, 1-8 (2015).
279. Pasold J, Zander K, Heskamp B *et al.* Positive impact of igf-1-coupled nanoparticles on the differentiation potential of human chondrocytes cultured on collagen scaffolds. *International journal of nanomedicine* 10, 1131-1143 (2015).
280. Felice B, Prabhakaran MP, Rodriguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 41, 178-195 (2014).
281. Oltolina F, Gregoletto L, Colangelo D, Gomez-Morales J, Delgado-Lopez JM, Prat M. Monoclonal antibody-targeted fluorescein-5-isothiocyanate-labeled biomimetic

Bibliografía

- nanoapatites: A promising fluorescent probe for imaging applications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 31(5), 1766-1775 (2015).
282. Conde J, Tian F, Hernandez Y *et al.* In vivo tumor targeting via nanoparticle-mediated therapeutic siRNA coupled to inflammatory response in lung cancer mouse models. *Biomaterials* 34(31), 7744-7753 (2013).
283. Niikura K, Kobayashi K, Takeuchi C *et al.* Amphiphilic gold nanoparticles displaying flexible bifurcated ligands as a carrier for siRNA delivery into the cell cytosol. *ACS applied materials & interfaces* 6(24), 22146-22154 (2014).
284. Xiong XG, Wang YL, Xu CQ, Qiu YH, Wang LS, Li J. On the gold-ligand covalency in linear [aux] complexes. *Dalton Trans*, (2015).
285. Wang J, Nie Y, Lu Y *et al.* Assembly of multivalent protein ligands and quantum dots: A multifaceted investigation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 30(8), 2161-2169 (2014).
286. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews* 105(4), 1103-1169 (2005).
287. Koch R. An address on bacteriological research. *British medical journal* 2(1546), 380-383 (1890).
288. Bertrand B, Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: The promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans* 43(11), 4209-4219 (2014).
289. Chaffman M, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Auranofin. A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatoid arthritis. *Drugs* 27(5), 378-424 (1984).
290. Lima JC, Rodriguez L. Applications of gold(i) alkynyl systems: A growing field to explore. *Chemical Society reviews* 40(11), 5442-5456 (2011).
291. Qian H, Zhu M, Wu Z, Jin R. Quantum sized gold nanoclusters with atomic precision. *Accounts of chemical research* 45(9), 1470-1479 (2012).
292. Faraday M. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical transactions. The Royal Society* 147, 145-181 (1857).
293. Sardar R, Funston AM, Mulvaney P, Murray RW. Gold nanoparticles: Past, present, and future. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 25(24), 13840-13851 (2009).
294. Muddineti OS, Ghosh B, Biswas S. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy. *International journal of pharmaceuticals* 484(1-2), 252-267 (2015).
295. Mie G. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Annalen der Physik* 330 1873, (1976).

296. Lee KS, El-Sayed MA. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *The journal of physical chemistry. B* 110(39), 19220-19225 (2006).
297. Chen H, Kou X, Yang Z, Ni W, Wang J. Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24(10), 5233-5237 (2008).
298. Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future. *Chemical Society reviews* 41(7), 2943-2970 (2012).
299. Mahmood U, Weissleder R. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2(5), 489-496 (2003).
300. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry. B* 110(14), 7238-7248 (2006).
301. Orendorff CJ, Sau TK, Murphy CJ. Shape-dependent plasmon-resonant gold nanoparticles. *Small* 2(5), 636-639 (2006).
302. Vo-Dinh T, Wang HN, Scaffidi J. Plasmonic nanoprobe for sers biosensing and bioimaging. *Journal of biophotonics* 3(1-2), 89-102 (2010).
303. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical reviews* 112(5), 2739-2779 (2012).
304. Jin CY, Yun J, Kim J *et al.* Highly integrated synthesis of heterogeneous nanostructures on nanowire heater array. *Nanoscale* 6(23), 14428-14432 (2014).
305. Nguyen DT, Kim DJ, Kim KS. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron* 42(3), 207-227 (2011).
306. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of materials* 13 (7), 2313-2322 (2001).
307. Kumar S, Gandhi KS, Kumar R. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *Industrial Engineering Chemistry Research* 46 (10), 3128-3136 (2007).
308. Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate. *Journal of the American Chemical Society* 129(45), 13939-13948 (2007).
309. Zhang J, Liu H, Wang Z, Ming N. Shape-selective synthesis of gold nanoparticles with controlled sizes, shapes, and plasmon resonances. *Advanced Functional Materials* 17(16), 3295-3303 (2007).
310. Ding Y, Zhang X, Liu X, Guo R. Adsorption characteristics of thionine on gold nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 22(5), 2292-2298 (2006).

Bibliografía

311. Shem PM, Sardar R, Shumaker-Parry JS. One-step synthesis of phosphine-stabilized gold nanoparticles using the mild reducing agent 9-bbn. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 25(23), 13279-13283 (2009).
312. Aryal S, B KCR, Dharmaraj N, Bhattarai N, Kim CH, Kim HY. Spectroscopic identification of s-au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 63(1), 160-163 (2006).
313. Bain CD, Evall J, Whitesides GM. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: Variation in the head group, tail group, and solvent. *Journal of the American Chemical Society* 111, (1989).
314. Zhou J, Ralston J, Sedev R, Beattie DA. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of colloid and interface science* 331(2), 251-262 (2009).
315. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 113(7), 823-839 (2005).
316. Alvarez PJ, Colvin V, Lead J, Stone V. Research priorities to advance eco-responsible nanotechnology. *ACS nano* 3(7), 1616-1619 (2009).
317. Tenzer S, Docter D, Rosfa S *et al.* Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano* 5(9), 7155-7167 (2011).
318. Aggarwal P, Hall JB, Mcleland CB, Dobrovolskaia MA, Mcneil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews* 61(6), 428-437 (2009).
319. Wang B, He X, Zhang Z, Zhao Y, Feng W. Metabolism of nanomaterials in vivo: Blood circulation and organ clearance. *Accounts of chemical research* 46(3), 761-769 (2013).
320. Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 10, 4321-4340 (2015).
321. Chen Z, Chen H, Meng H *et al.* Bio-distribution and metabolic paths of silica coated cdses quantum dots. *Toxicology and applied pharmacology* 230(3), 364-371 (2008).
322. Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong CN, Yu LE, Ong WY. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31(8), 2034-2042 (2010).
323. Zhu MT, Wang Y, Feng WY *et al.* Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(12), 8584-8590 (2010).
324. Guichard Y, Schmit J, Darne C *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in syrian hamster embryo cells. *The Annals of occupational hygiene* 56(5), 631-644 (2012).

325. Moller P, Jacobsen NR, Folkmann JK *et al.* Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free radical research* 44(1), 1-46 (2010).
326. Ma X, Wu Y, Jin S *et al.* Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS nano* 5(11), 8629-8639 (2011).
327. Liu YK, Ye J, Han QL, Tao R, Liu F, Wang W. Toxicity and bioactivity of cobalt nanoparticles on the monocytes. *Orthopaedic surgery* 7(2), 168-173 (2015).
328. Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 6(7), 832-842 (2010).
329. Ge C, Lao F, Li W *et al.* Quantitative analysis of metal impurities in carbon nanotubes: Efficacy of different pretreatment protocols for icpms spectroscopy. *Analytical chemistry* 80(24), 9426-9434 (2008).
330. Tang J, Huang J, Man SQ. Preparation of gold nanoparticles by surfactant-promoted reductive reaction without extra reducing agent. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 103, 349-355 (2013).
331. Alkilany AM, Nalaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5(6), 701-708 (2009).
332. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical reviews in oncology/hematology* 43(1), 33-56 (2002).
333. Simon CJ, Dupuy DE, Mayo-Smith WW. Microwave ablation: Principles and applications. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 25 Suppl 1, S69-83 (2005).
334. Vilos GA, Edris F. Second-generation endometrial ablation technologies: The hot liquid balloons. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 21(6), 947-967 (2007).
335. Datta NR, Ordonez SG, Gaipl US *et al.* Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer treatment reviews*, (2015).
336. Urano M, Kuroda M, Nishimura Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 15(2), 79-107 (1999).
337. Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 10(4), 457-483 (1994).
338. Lindner LH, Issels RD. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Current treatment options in oncology* 12(1), 12-20 (2011).

Bibliografía

339. Horsman MR, Overgaard J. Hyperthermia: A potent enhancer of radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19(6), 418-426 (2007).
340. Van Der Zee J, Vujaskovic Z, Kondo M, Sugahara T. The kadota fund international forum 2004--clinical group consensus. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 24(2), 111-122 (2008).
341. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of bioscience and bioengineering* 100(1), 1-11 (2005).
342. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery* 146(4), 596-606 (1957).
343. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: An in vivo study. *Japanese journal of cancer research : Gann* 89(4), 463-469 (1998).
344. Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, Jimbow K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)* 9(11), 1715-1726 (2014).
345. Verma J, Lal S, Van Noorden CJ. Nanoparticles for hyperthermic therapy: Synthesis strategies and applications in glioblastoma. *International journal of nanomedicine* 9, 2863-2877 (2014).
346. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology* 19(4), 316-317 (2001).
347. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (pptt) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science* 23(3), 217-228 (2008).
348. Hwang S, Nam J, Jung S, Song J, Doh H, Kim S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: Current status and future perspective. *Nanomedicine (Lond)* 9(13), 2003-2022 (2014).
349. Hainfeld JF, Lin L, Slatkin DN, Avraham Dilmanian F, Vadas TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 10(8), 1609-1617 (2014).
350. Matsumoto H, Takahashi A, Wang X, Ohnishi K, Ohnishi T. Transfection of p53-knockout mouse fibroblasts with wild-type p53 increases the thermosensitivity and stimulates apoptosis induced by heat stress. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 39(1), 197-203 (1997).
351. Burd R, Dziedzic TS, Xu Y, Caligiuri MA, Subjeck JR, Repasky EA. Tumor cell apoptosis, lymphocyte recruitment and tumor vascular changes are induced by low temperature, long duration (fever-like) whole body hyperthermia. *Journal of cellular physiology* 177(1), 137-147 (1998).
352. Baronzio G, Gramaglia A, Fiorentini G. Hyperthermia and immunity. A brief overview. *In Vivo* 20(6A), 689-695 (2006).

353. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 92(19), 1564-1572 (2000).
354. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232(4749), 522-524 (1986).
355. Xie K, Huang S. Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clinical & experimental metastasis* 20(1), 31-43 (2003).
356. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332(6167), 800-805 (1988).
357. Wei MC, Zong WX, Cheng EH *et al.* Proapoptotic bax and bak: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517), 727-730 (2001).
358. Lakhani SA, Masud A, Kuida K *et al.* Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311(5762), 847-851 (2006).
359. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF *et al.* Tumor suppression at the mouse ink4a locus mediated by the alternative reading frame product p19arf. *Cell* 91(5), 649-659 (1997).
360. Anel A, Aguilo JI, Catalan E *et al.* Protein kinase c-theta (pkc-theta) in natural killer cell function and anti-tumor immunity. *Frontiers in immunology* 3, 187 (2012).
361. Alava MA, Debell KE, Conti A, Hoffman T, Bonvini E. Increased intracellular cyclic amp inhibits inositol phospholipid hydrolysis induced by perturbation of the t cell receptor/cd3 complex but not by g-protein stimulation. Association with protein kinase a-mediated phosphorylation of phospholipase c-gamma 1. *Biochem J* 284 (Pt 1), 189-199 (1992).
362. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine* 182(2), 367-377 (1995).
363. Pardo J, Bosque A, Brehm R *et al.* Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme a and/or granzyme b in ctl-mediated target cell lysis. *The Journal of cell biology* 167(3), 457-468 (2004).
364. Bae KH, Park M, Do MJ *et al.* Chitosan oligosaccharide-stabilized ferrimagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia. *ACS nano* 6(6), 5266-5273 (2012).
365. Krpetic Z, Nativo P, See V, Prior IA, Brust M, Volk M. Inflicting controlled nonthermal damage to subcellular structures by laser-activated gold nanoparticles. *Nano letters* 10(11), 4549-4554 (2010).
366. Beloribi-Djefafia S, Siret C, Lombardo D. Exosomal lipids induce human pancreatic tumoral miapaca-2 cells resistance through the cxcr4-sdf-1alpha signaling axis. *Oncoscience* 2(1), 15-30 (2015).

Bibliografía

367. Szymanska Z, Urbanski J, Marciniak-Czochra A. Mathematical modelling of the influence of heat shock proteins on cancer invasion of tissue. *Journal of mathematical biology* 58(4-5), 819-844 (2009).
368. Day ES, Bickford LR, Slater JH, Riggall NS, Drezek RA, West JL. Antibody-conjugated gold-gold sulfide nanoparticles as multifunctional agents for imaging and therapy of breast cancer. *International journal of nanomedicine* 5, 445-454 (2010).
369. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: A review. *Cell proliferation* 33(6), 341-365 (2000).
370. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501 (1998).
371. Stepczynska A, Lauber K, Engels IH *et al.* Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 20(10), 1193-1202 (2001).
372. Bando M, Miyake Y, Shiina M, Wachi M, Nagai K, Kataoka T. Actin cytoskeleton is required for early apoptosis signaling induced by anti-fas antibody but not fas ligand in murine b lymphoma a20 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 290(1), 268-274 (2002).
373. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27(50), 6434-6451 (2008).
374. Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin d mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(9), 1592-1594 (2001).
375. Cirman T, Oresic K, Mazovec GD *et al.* Selective disruption of lysosomes in hela cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *The Journal of biological chemistry* 279(5), 3578-3587 (2004).
376. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D *et al.* Cathepsin b acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology* 153(5), 999-1010 (2001).
377. Brunk UT, Svensson I. Oxidative stress, growth factor starvation and fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox report : communications in free radical research* 4(1-2), 3-11 (1999).
378. Yuan XM, Li W, Dalen H *et al.* Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9), 6286-6291 (2002).
379. Zang Y, Beard RL, Chandraratna RA, Kang JX. Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid cd437 in human leukemia hl-60 cells. *Cell death and differentiation* 8(5), 477-485 (2001).
380. Baffou G, Girard C, Quidant R. Mapping heat origin in plasmonic structures. *Physical review letters* 104(13), 136805 (2010).

381. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207(9), 1807-1817 (2010).
382. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140(5), 619-630 (2010).
383. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in mfg-e8-deficient mice. *Science* 304(5674), 1147-1150 (2004).
384. Kawane K, Ohtani M, Miwa K *et al.* Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443(7114), 998-1002 (2006).
385. Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G *et al.* Requirement of dnase ii for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292(5521), 1546-1549 (2001).
386. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 68, 383-424 (1999).
387. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the bcl-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(1), 49-63 (2014).
388. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y *et al.* Somatic frameshift mutations in the bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275(5302), 967-969 (1997).
389. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228(4706), 1440-1443 (1985).
390. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature cell biology* 3(11), E255-263 (2001).
391. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell death and differentiation* 8(6), 569-581 (2001).
392. Turk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: Caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS letters* 581(15), 2761-2767 (2007).
393. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A *et al.* Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry* 283(27), 19140-19150 (2008).
394. Miao Q, Sun Y, Wei T *et al.* Chymotrypsin b cached in rat liver lysosomes and involved in apoptotic regulation through a mitochondrial pathway. *The Journal of biological chemistry* 283(13), 8218-8228 (2008).
395. Zhao K, Zhao X, Tu Y *et al.* Lysosomal chymotrypsin b potentiates apoptosis via cleavage of bid. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(15), 2665-2678 (2010).
396. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y *et al.* Peg-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 114(3), 343-347 (2006).

Bibliografía

397. Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 95(2), 300-312 (2007).
398. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death & disease* 4, e532 (2013).
399. Hahn S, Erb P. The immunomodulatory role of cd4-positive cytotoxic t-lymphocytes in health and disease. *International reviews of immunology* 18(5-6), 449-464 (1999).
400. Moros M, Pelaz B, Lopez-Larrubia P, Garcia-Martin ML, Grazu V, De La Fuente JM. Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* 2(9), 1746-1755 (2010).
401. Pisanic T, Jin S, Shubayev V. *Iron oxide magnetic nanoparticle nanotoxicity: Incidence and mechanisms, in nanotoxicity*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 397-425 (2009).
402. Stroh A, Zimmer C, Gutzeit C *et al.* Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free radical biology & medicine* 36(8), 976-984 (2004).
403. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. Nanotoxicology. *Occupational and environmental medicine* 61(9), 727-728 (2004).
404. Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and histopathology* 20(1), 205-219 (2005).
405. Diaz B, Sanchez-Espinel C, Arruebo M *et al.* Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small* 4(11), 2025-2034 (2008).
406. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 35(Pt 5), 1147-1150 (2007).
407. Li JJ, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LY. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31(23), 5996-6003 (2010).
408. Arvizo RR, Moyano DF, Saha S *et al.* Probing novel roles of the mitochondrial uniporter in ovarian cancer cells using nanoparticles. *The Journal of biological chemistry* 288(24), 17610-17618 (2013).
409. Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: An overview. *Methods Mol Biol* 731, 219-236 (2011).
410. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 16(2), 230-239 (1975).
411. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and

- specificity. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 16(2), 216-229 (1975).
412. Tortorella D, Gewurz B, Schust D, Furman M, Ploegh H. Down-regulation of mhc class i antigen presentation by hcmv; lessons for tumor immunology. *Immunological investigations* 29(2), 97-100 (2000).
413. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of h-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319(6055), 675-678 (1986).
414. Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunological reviews* 181, 170-184 (2001).
415. Cassidy SA, Cheent KS, Khakoo SI. Effects of peptide on nk cell-mediated mhc i recognition. *Frontiers in immunology* 5, 133 (2014).
416. Raulet DH. Roles of the nkg2d immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews. Immunology* 3(10), 781-790 (2003).
417. Sun JC, Lanier LL. Nk cell development, homeostasis and function: Parallels with cd8(+) t cells. *Nature reviews. Immunology* 11(10), 645-657 (2011).
418. Hong S, Scherer DC, Singh N *et al.* Lipid antigen presentation in the immune system: Lessons learned from cd1d knockout mice. *Immunological reviews* 169, 31-44 (1999).
419. Walzer T, Blery M, Chaix J *et al.* Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse nk cells via nkp46. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9), 3384-3389 (2007).
420. Olivier J. Phenotyping nk cells and nkt cells populations by flow cytometry.
421. Petrarca C, Clemente E, Amato V *et al.* Engineered metal based nanoparticles and innate immunity. *Clinical and molecular allergy : CMA* 13(1), 13 (2015).
422. Frohlich E. Value of phagocyte function screening for immunotoxicity of nanoparticles in vivo. *International journal of nanomedicine* 10, 3761-3778 (2015).
423. Tomic S, Ethokic J, Vasilijic S *et al.* Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. *PloS one* 9(5), e96584 (2014).
424. Liu Z, Li W, Wang F *et al.* Enhancement of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-6 production by pegylated gold nanoparticles in raw264.7 cells. *Nanoscale* 4(22), 7135-7142 (2012).
425. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Nk cells in innate immunity. *Current opinion in immunology* 17(1), 29-35 (2005).
426. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 195(3), 335-341 (2002).

Bibliografía

427. Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* 13, 251-276 (1995).
428. Cantoni C, Bottino C, Vitale M *et al.* Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of experimental medicine* 189(5), 787-796 (1999).
429. Nielsen N, Pascal V, Fasth AE *et al.* Balance between activating nkg2d, dnam-1, nkp44 and nkp46 and inhibitory cd94/nkg2a receptors determine natural killer degranulation towards rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Immunology* 142(4), 581-593 (2014).
430. Krzewski K, Coligan JE. Human nk cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in immunology* 3, 335 (2012).
431. Marquis BJ, Liu Z, Braun KL, Haynes CL. Investigation of noble metal nanoparticle zeta-potential effects on single-cell exocytosis function in vitro with carbon-fiber microelectrode amperometry. *The Analyst* 136(17), 3478-3486 (2011).
432. Noel C, Simard JC, Girard D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 31, 12-22 (2015).
433. Butler B, Cooper JA. Distinct roles for the actin nucleators arp2/3 and hdia1 during nk-mediated cytotoxicity. *Current biology : CB* 19(22), 1886-1896 (2009).
434. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA *et al.* Biodistribution of peg-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31(25), 6574-6581 (2010).
435. Lee MJ, Veisheh O, Bhattarai N *et al.* Rapid pharmacokinetic and biodistribution studies using choleroxin-conjugated iron oxide nanoparticles: A novel non-radioactive method. *PloS one* 5(3), e9536 (2010).
436. Choi HS, Liu W, Misra P *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology* 25(10), 1165-1170 (2007).
437. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29(12), 1912-1919 (2008).
438. Kreyling WG, Abdelmonem AM, Ali Z *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nature nanotechnology* 10(7), 619-623 (2015).
439. Michael B, Yano B, Sellers RS *et al.* Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: A review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic pathology* 35(5), 742-750 (2007).
440. Nagaraju K, Gordish H. Serum creatine kinase analysis in mouse models of muscular dystrophy. *MD_M.2.2.001*, (2014).

441. Goodman CM, Mccusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry* 15(4), 897-900 (2004).
442. Pan Y, Neuss S, Leifert A *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), 1941-1949 (2007).
443. Zhang XD, Guo ML, Wu HY *et al.* Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. *International journal of nanomedicine* 4, 165-173 (2009).
444. Cho WS, Cho M, Jeong J *et al.* Size-dependent tissue kinetics of peg-coated gold nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology* 245(1), 116-123 (2010).
445. You J, Zhou J, Zhou M *et al.* Pharmacokinetics, clearance, and biosafety of polyethylene glycol-coated hollow gold nanospheres. *Particle and fibre toxicology* 11, 26 (2014).
446. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics* 5(4), 505-515 (2008).
447. Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M *et al.* Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and fibre toxicology* 4, 10 (2007).
448. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology today* 12(9), 322-326 (1991).
449. Morgan BP. Complement regulatory molecules: Application to therapy and transplantation. *Immunology today* 16(6), 257-259 (1995).
450. Schluep T, Hwang J, Hildebrandt IJ *et al.* Pharmacokinetics and tumor dynamics of the nanoparticle it-101 from pet imaging and tumor histological measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(27), 11394-11399 (2009).
451. Zhang XD, Wu D, Shen X *et al.* Size-dependent in vivo toxicity of peg-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 6, 2071-2081 (2011).
452. Chanda N, Kattumuri V, Shukla R *et al.* Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(19), 8760-8765 (2010).
453. Fox ME, Szoka FC, Frechet JM. Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: The importance of molecular architecture. *Accounts of chemical research* 42(8), 1141-1151 (2009).
454. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* 46(12 Pt 1), 6387-6392 (1986).
455. Noguchi Y, Wu J, Duncan R *et al.* Early phase tumor accumulation of macromolecules: A great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Japanese journal of cancer research : Gann* 89(3), 307-314 (1998).

Bibliografía

456. Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the epr effect: Background and future prospects. *Bioconjugate chemistry* 21(5), 797-802 (2010).
457. Maeda H. The enhanced permeability and retention (epr) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in enzyme regulation* 41, 189-207 (2001).
458. Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer metastasis reviews* 6(4), 559-593 (1987).
459. Koch AE. Review: Angiogenesis: Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 41(6), 951-962 (1998).
460. Venkatachalam MA, Rennke HG. The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circulation research* 43(3), 337-347 (1978).
461. Sadauskas E, Jacobsen NR, Danscher G *et al.* Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chemistry Central journal* 3, 16 (2009).
462. Peracchia MT, Fattal E, Desmaele D *et al.* Stealth pegylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 60(1), 121-128 (1999).
463. Hostetler MJ, Wingate JE, Zhong C-J *et al.* Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 14, 17-30 (1998).
464. Ito E, Kang H, Lee D, Park JB, Hara M, Noh J. Spontaneous desorption and phase transitions of self-assembled alkanethiol and alicyclic thiol monolayers chemisorbed on au(111) in ultrahigh vacuum at room temperature. *Journal of colloid and interface science* 394, 522-529 (2013).
465. Hostetler MJ, Templeton AC, Murray RW. Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 15, 3782-3789 (1999).
466. Tsai DH, Shelton MP, Delrio FW *et al.* Quantifying dithiothreitol displacement of functional ligands from gold nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404(10), 3015-3023 (2012).
467. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth me.Peg-pla nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *Journal of pharmaceutical sciences* 84(4), 493-498 (1995).
468. Al Zaki A, Hui JZ, Higbee E, Tsourkas A. Biodistribution, clearance, and toxicology of polymeric micelles loaded with 0.9 or 5 nm gold nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology* 11(10), 1836-1846 (2015).
469. Wang J, Zhou G, Chen C *et al.* Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters* 168(2), 176-185 (2007).

-
470. Kwon KC, Ryu JH, Lee JH *et al.* Proteinticle/gold core/shell nanoparticles for targeted cancer therapy without nanotoxicity. *Adv Mater* 26(37), 6436-6441 (2014).
471. Zhang XD, Wu D, Shen X, Liu PX, Fan FY, Fan SJ. In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. *Biomaterials* 33(18), 4628-4638 (2012).
472. Guo L, Panderi I, Yan DD *et al.* A comparative study of hollow copper sulfide nanoparticles and hollow gold nanospheres on degradability and toxicity. *ACS nano* 7(10), 8780-8793 (2013).
473. Lai CY, Kruse DE, Caskey CF, Stephens DN, Sutcliffe PL, Ferrara KW. Noninvasive thermometry assisted by a dual-function ultrasound transducer for mild hyperthermia. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 57(12), 2671-2684 (2010).
474. Luster MI, Portier C, Pait DG *et al.* Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 18(2), 200-210 (1992).
475. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters* 7(6), 1542-1550 (2007).
476. Kam NW, Liu Z, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* 45(4), 577-581 (2006).
477. Andersson-Willman B, Gehrman U, Cansu Z *et al.* Effects of subtoxic concentrations of tio₂ and zno nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicology and applied pharmacology* 264(1), 94-103 (2012).
478. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology* 12(7), 2313-2333 (2010).