

73960

**IBARRA, LUIS EXEQUIE**

nanoparticulas de po

2015

**73960**



**Nanopartículas de polianilina y  
su aplicación en terapia  
fotoasistida contra el cáncer**

**Doctorado en Ciencia, Tecnología  
e Innovación Agropecuaria**

**M.V. Luis Exequiel Ibarra**

**Marzo 2015**



**Universidad Nacional de Río Cuarto**

**Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación  
Agropecuaria**

**Tesis Doctoral**

**“NANOPARTÍCULAS DE POLIANILINA Y SU  
APLICACIÓN EN TERAPIA FOTOASISTIDA  
CONTRA EL CÁNCER”**

**“NANOPARTÍCULAS DE POLIANILINA E SUA  
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTOASSISTIDA  
CONTRA O CÁNCER”**

**Luis Exequiel Ibarra**

**2015**

75300

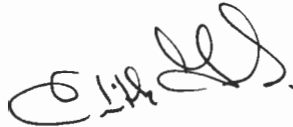
<b>MFN:</b>
Clasif:
T.927



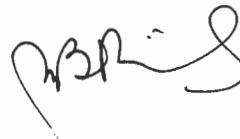
El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Rio Cuarto.

Doctorando: M.V. Luis Exequiel Ibarra

Directora: Dra. Edith Inés Yslas



Co-directora: MSc. Mabel Lucia Bertuzzi



Co-director externo: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Comisión de tesis:

Dra. Adriana Casas

Dra. Haydee Fukuda



Dra. Patricia Pons



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional de Río Cuarto, institución pública y gratuita que permite no solamente la formación de profesionales, sino también el crecimiento y especialización a través de carreras de postgrado.

A mis papas, que aunque los tenga lejos, siempre me hacen notar sus cariños y están presentes en todo momento.

A mis hermanos que siempre confiaron en mí y me apoyan en todas las decisiones que tomo.

A Inesilla, mi directora. Gracias por todo... formamos un gran equipo que dio muchos frutos. Gracias por todas tus enseñanzas.

A Mabel, mi otra directora, por iniciarme en la investigación, en la docencia, por permitirme crecer. Mucho de lo que soy te lo debo a vos.

A Vivi, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y confiar en mí. Por esas ganas interminables de conocimiento y por todo tu cariño que dedicas a esto y a tu gente.

A Carlos, mi compañero de vida, sos un pilar muy importante en todo. Tus consejos ayudaron mucho a que pudiera estar defendiendo esta tesis.

A los miembros del jurado, Adriana, Haydee y Patricia. Muchas gracias por todo el seguimiento y los aportes realizados a esta tesis.

Al Dr. José Roberto por su predisposición y por ser parte de esta tesis doctoral.

A todos los miembros del laboratorio 14, especialmente a Laurilla, Belén, Sol, Flor, Juli y a los muchachotes Matías y Renzo. Se hace muy placentero el trabajo compartiéndolo con uds.

A toda la gente de Fisiología Animal, especialmente Willy, Dante, Cintia, mis compañeros de laboratorio con los que comparto día a día. A Nancy, Nora, Marta, Pablo, Vero por los momentos compartidos. No me olvido de los más jóvenes, Anita, Flor, Ale, Fabri, Ceci, Diego por todo el afecto y compañerismo.

A Silvia por todo el asesoramiento en el análisis histopatológico y las charlas con mates.

Al Depto. de Biología Molecular, por brindarme un lugar de trabajo cálido y con las herramientas necesarias para cumplir los objetivos de la tesis.

Quiero agradecer al Conicet y al Ministerio de Educación de la Prov. De Córdoba que me brindaron la ayuda económica para poder dedicarme de lleno a mis estudios de Doctorado.

Por último, a mis amigos queridos, especialmente Ivan, Luis, Barby, Facu, Julia, Juli, Amanda y Sari. Por todas las juntadas. De alguna u otra manera colaboraron en este trabajo e hicieron que fuera posible.

## INDICE

Abreviaturas

Resumen

### INTRODUCCION

1. Nanotecnología .....	1
1.1. Nanomedicina .....	2
2. Cáncer .....	3
2.1. Patogenia del cáncer .....	4
2.2. Características de las células tumorales .....	7
2.3. Apoptosis y cáncer .....	9
2.4. Epidemiología del cáncer .....	9
2.5. Terapias contra el cáncer .....	11
2.5.1. Cirugía .....	11
2.5.2. Quimioterapia .....	11
2.5.3. Inmunoterapia .....	11
2.5.4. Terapia génica .....	12
2.5.5. Terapia hormonal .....	12
2.5.6. Radioterapia .....	13
2.5.7. Terapias fotoasistidas .....	13
2.5.7.1. Terapia fotodinámica .....	13
3. Terapia fototérmica .....	14
3.1. Efectos biológicos de la terapia fototérmica .....	16
3.2. Métodos para generar hipertermia .....	18
3.3. Nanomateriales en terapia fototérmica .....	20
3.3.1. Nanopartículas de oro .....	21
3.3.2. Nanotubos de carbono .....	22
3.3.3. Nanopartículas a base de polímeros conjugados .....	23
3.3.3.1. Polianilina .....	23
4. Nanotoxicología .....	25
4.1. Mecanismos de toxicidad de nanomateriales .....	27
4.2. Modelos experimentales para análisis de la toxicidad de nanomateriales .....	28
Bibliografía .....	30

**HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

5.1. Hipótesis .....	44
5.2. Objetivo general .....	44
5.3. Objetivos específicos .....	44

**MATERIALES Y METODOS**

6. Materiales .....	45
6.1. Medios de cultivos celulares .....	45
6.2. Soluciones .....	45
6.3. Nanomateriales .....	48
6.3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de polianilina .....	48
6.4. Sistema de irradiación .....	50
7. Metodología .....	50
7.1. Preparación de las diferentes suspensiones de Np-PANI .....	50
7.2. Producción de calor por absorción de la luz NIR .....	50
7.3. Experimentos in vitro en líneas celulares tumorigénicas y normales .....	51
7.3.1. Cultivos celulares .....	51
7.3.2. Evaluación de la citotoxicidad per se de Np-PANI .....	51
7.3.2.1. Ensayo de viabilidad celular por MTT .....	51
7.3.2.2. Ensayo de la viabilidad celular por rojo neutro .....	52
7.3.2.3. Ensayo de la viabilidad celular por azul Tripán .....	52
7.3.2.4. Ensayo de formación de colonias .....	53
7.3.3. Incorporación celular de las Np-PANI .....	53
7.3.3.1. Inhibición de la endocitosis .....	54
7.3.4. Tratamiento fototérmico en cultivos 2D de células tumorales .....	54
7.3.4.1. Evaluación de las características morfológicas celulares .....	55
7.3.4.2. Evaluación de las características morfológicas nucleares .....	55
7.3.4.3. Determinación del estrés oxidativo pre y post TFT .....	55
7.3.5. Modelo de cultivos tridimensionales: esferoides .....	56
7.3.5.1. Tratamiento fototérmico en cultivos 3D (esferoides) .....	57
7.3.5.2. Ensayo de la viabilidad celular por fosfatasa ácida .....	58
7.4. Experimentos in vivo en <i>Rhinella arenarum</i> .....	59
7.4.1. Evaluación de la toxicidad de Np-PANI en <i>R. arenarum</i> .....	59
7.4.1.1. Obtención de las larvas por fecundación in-vitro .....	59
7.4.1.2. Test de toxicidad aguda con larvas S.25 .....	60
7.4.1.3. Test de teratogénesis .....	60

7.4.1.4. Acumulación, localización y excreción de Np-PANI en larvas S.25 de <i>R. arenarum</i> .....	61
7.5. Experimentos in vivo en ratones Balb/c .....	62
7.5.1. Animales .....	62
7.5.2. Funcionalidad hepática y renal .....	63
7.5.3. Modelo tumoral en ratones Balb/c .....	63
7.5.4. Tratamiento fototérmico in vivo .....	64
7.5.5. Estudios post Terapia fototérmica en ratones portadores de tumores .....	64
7.5.5.1. Viabilidad tumoral con tinción de azul de Evans .....	64
7.5.5.2. Histopatología de órganos y tumores .....	65
7.5.5.3. Estudios de toxicidad de Np-PANI post TFT .....	66
7.6. Estudios estadísticos .....	66
Bibliografía .....	67
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
8.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de polianilina .....	70
8.2. Experimentos in vitro en líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas .....	77
8.2.1. Evaluación de la viabilidad celular de cultivos incubados con Np-PANI en oscuridad .....	77
8.2.2. Incorporación celular de Np-PANI .....	82
8.2.3. Evaluación de la actividad fototérmica de Np-PANI en cultivos 2D .....	86
8.2.4. Evaluación de estrés oxidativo pre y post tratamiento fototérmico .....	89
8.2.5. Formación de esferoides con la línea celular LM2 .....	93
8.2.6. Evaluación de la actividad fototérmica de Np-PANI en cultivos 3D .....	93
8.3. Experimentos in vivo en <i>Rhinella arenarum</i> .....	96
8.3.1. Test agudo de letalidad en larvas de <i>R. arenarum</i> tras la exposición a Np-PANI .....	97
8.3.2. Test de teratogénesis en embriones de <i>R. arenarum</i> .....	100
8.3.3. Acumulación, distribución y excreción de Np-PANI en larvas S.25 de <i>R. arenarum</i> .....	105
8.4. Experimentos in vivo en ratones Balb/c .....	109
8.4.1. Toxicidad in vivo de Np-PANI en ratones Balb/c .....	109
8.4.2. Terapia fototérmica en ratones portadores de tumores .....	111
8.4.3. Estudios post terapia fototérmica en ratones portadores de tumores .....	113
8.4.3.1. Viabilidad de tumores por tinción con azul de Evans .....	113
8.4.3.2. Histopatología de tumores y órganos .....	114

8.4.3.3. <i>Bioquímica sanguínea de parámetros fisiológicos de funcionalidad de órganos</i> .....	118
<i>Bibliografía</i> .....	120
<b>CONCLUSIONES</b> .....	126



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Nanoestructuras artificiales y biológicas .....	2
<b>Figura 2:</b> Formación de una masa tumoral .....	4
<b>Figura 3:</b> Etapas del proceso de carcinogénesis .....	6
<b>Figura 4:</b> Incidencia de cáncer mundial (2012) .....	10
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica .....	14
<b>Figura 6:</b> Terapia fototérmica sobre células tumorales .....	15
<b>Figura 7:</b> Efectos biológicos luego de la terapia fototérmica .....	17
<b>Figura 8:</b> Métodos de generación de hipertermia para el tratamiento de enfermedades cancerosas .....	20
<b>Figura 9:</b> Diferentes nanomateriales a base de carbono, oro y metales oxidados con aplicaciones en terapia fototérmica .....	21
<b>Figura 10:</b> Diferentes estados de oxidación de la polianilina .....	25
<b>Figura 11:</b> Método de síntesis descrito por Stejskal; El modelo de formación de partículas coloidales .....	49
<b>Figura 12:</b> Esquema representativo de la generación de esferoides .....	57
<b>Figura 13:</b> Formación de tumores y TFT en ratones .....	64
<b>Figura 14:</b> Tamaño y distribución de Np-PANI 1 obtenido mediante a) microscopia electrónica de transmisión (TEM) y b) microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	71
<b>Figura 15:</b> Tamaño y distribución de Np-PANI 2 obtenido mediante a) microscopia electrónica de transmisión (TEM) y b) microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	71
<b>Figura 16:</b> Espectro UV-visible de Np-PANI en solución a distintos pH .....	73
<b>Figura 17:</b> Variación de temperatura ( $\Delta T$ ) de Np-PANI 1 en solución a diferentes tiempos de irradiación con el láser NIR .....	73
<b>Figura 18:</b> Variación de temperatura ( $\Delta T$ ) de Np-PANI 2 en solución a diferentes tiempos de irradiación con el láser NIR .....	74
<b>Figura 19:</b> Curvas de calibración de a) Np-PANI 1 y b) Np-PANI 2 en buffer acetato de Na/ácido acético 1M .....	76
<b>Figura 20:</b> Dispersiones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en: a) PBS 1X 200 mg/ml de PANI; b) solución de Ringer 10% en PBS 100 mg/ml de PANI y c) DMEM con SFB 10% 1 mg/ml de PANI. ....	77
<b>Figura 21:</b> Efecto de la exposición a NP-PANI 1 y Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2 mediante la técnica de exclusión de azul Tripán .....	78



<b>Figura 22:</b> Efecto de la exposición a NP-PANI 1 y Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2 mediante la técnica MTT.....	79
<b>Figura 23:</b> Efecto de la exposición a NP-PANI 1 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2, CT26 y HaCaT mediante la técnica MTT y rojo neutro .....	80
<b>Figura 24:</b> Ensayo de formación de colonias con células LM2 luego de la exposición a Np-PANI durante 24 horas .....	82
<b>Figura 25:</b> Cinética de incorporación de a) NP-PANI 1 y b) Np-PANI 2 en las células LM2 incubadas a distintas concentraciones durante diferentes tiempos .....	83
<b>Figura 26:</b> Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de internalización de Np-PANI 1 en células LM2 .....	85
<b>Figure 27:</b> Efecto de la TFT con Np-PANI 1 sobre la morfología de células LM2 observadas mediante campo claro (panel izquierdo) y tinción con azul de toluidina (panel derecho) (10X) .....	87
<b>Figura 28:</b> Efecto de la TFT con Np-PANI 1 sobre la morfología nuclear de células LM2 analizadas mediante tinción con Hoechst .....	88
<b>Figura 29:</b> Efecto de la TFT con Np-PANI 2 sobre la morfología de células LM2 observadas mediante campo claro (panel izquierdo) y tinción con azul de toluidina (panel derecho) (10X).....	89
<b>Figura 30:</b> Células LM2 sometidas a la exposición de Np-PANI 1 y luego de la TFT incubadas con el fluoróforo DCFH-DA .....	91
<b>Figura 31:</b> Células LM2 sometidas a la exposición de Np-PANI 2 y luego de la TFT incubadas con el fluoróforo DCFH-DA .....	92
<b>Figura 32:</b> Células LM2 incubadas previamente con DCFH-DA y expuestas a una solución de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 µM (control positivo) y tratadas con luz NIR durante 15 min (control luz y negativo).....	92
<b>Figura 33:</b> Esferoides generados con la línea celular LM2 mediante la técnica de gota colgante empleando dos densidades celulares .....	93
<b>Figura 34:</b> Esferoides 24 horas post TFT (10X) .....	94
<b>Figura 35:</b> Efecto de NP-PANI 1 en condiciones de oscuridad y luego de la iluminación con láser NIR 15 sobre la viabilidad celular en esferoides de LM2 .....	95
<b>Figura 36:</b> Efecto de NP-PANI 2 en condiciones de oscuridad y luego de la iluminación con láser NIR 15 sobre la viabilidad celular en esferoides de LM2 .....	95
<b>Figura 37:</b> Test de toxicidad aguda en larvas S.25 incubadas a diferentes concentraciones de Np-PANI 1 .....	97

<b>Figura 38:</b> Test de toxicidad aguda en larvas S.25 incubadas a diferentes concentraciones de Np-PANI 2 .....	98
<b>Figura 39:</b> Porcentaje de embriones normales luego de la exposición por 96 horas a distintas concentraciones de PVP 2% en PBS y Np-PANI 1 .....	101
<b>Figura 40:</b> Porcentaje de embriones normales luego de la exposición por 96 horas a distintas concentraciones de PVP + PNIPAM 1% en PBS y Np-PANI 2 .....	101
<b>Figura 41:</b> Porcentaje de mortalidad en embriones expuestos a Np-PANI 1 y PVP 2% en PBS .....	102
<b>Figura 42:</b> Embriones de <i>R. arenarum</i> expuestos a Np-PANI 1 y 2 .....	104
<b>Figura 43:</b> Contenido intestinal de Np-PANI en larvas S.25 de <i>Rhinella arenarum</i> expuestas a 0,5 mg/ml de ambas Np-PANI después de 96 h .....	105
<b>Figura 44:</b> Espectros UV-visibles de muestras de materia fecal disueltas en NMP y EtOH .....	106
<b>Figura 45:</b> Larvas S.25 observadas bajo lupa estereotípica .....	106
<b>Figura 46:</b> Cortes histológicos sagitales de larvas S.25 luego de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 (0,5 mg/ml) .....	107
<b>Figura 47:</b> Cortes histológicos de larvas S.25 de <i>R. arenarum</i> (40X) .....	108
<b>Figura 48:</b> Valores séricos de urea (mg/dl) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento .....	110
<b>Figura 49:</b> Valores séricos de creatinina (mg/dl) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento .....	111
<b>Figura 50:</b> Valores séricos de GPT (UI/L) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento .....	111
<b>Figura 51:</b> Crecimiento de los tumores LM2 en ratones de los distintos grupos de tratamiento después de la aplicación de TFT .....	112
<b>Figura 52:</b> Fotografías de ratones portadores de tumores pertenecientes a los distintos grupos tratamientos 7 días post terapia fototérmica .....	113
<b>Figura 53:</b> Tumores luego de la TFT teñidos con azul de Evans .....	114
<b>Figura 54:</b> Cortes histológicos de tumores 7 días luego de TFT teñidos con H&E .....	115
<b>Figura 55:</b> Cortes histológicos de órganos de los distintos grupos tratamientos .....	117
<b>Figura 56:</b> Niveles de urea (a), creatinina (b) y GPT (c) en suero de ratones portadores de tumores 10 días post TFT .....	118

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Caracterización de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 mediante DLS y potencial zeta.....	72
<b>Tabla 2:</b> Análisis Probit de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en larvas S.25 de <i>R. arenarum</i> .....	99
<b>Tabla 3:</b> Análisis Probit de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en embriones del estadio S.2 - S.4 de <i>R. arenarum</i> .....	102

## **ABREVIATURAS**

**APH: p-nitrofenilfosfato**

**CL<sub>50</sub>: concentración letal 50**

**CL<sub>99</sub>: concentración letal 99**

**CT<sub>50</sub>: concentración teratogénica 50**

**CT<sub>99</sub>: concentración teratogénica 99 la concentración no teratogénica**

**DCF: diclorofluoresceína**

**DCFA: diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína**

**DL<sub>50</sub>: dosis letal 50**

**DLS: dispersión de luz dinámica**

**DMSO: dimetilsulfoxido**

**EB: base de esmeraldina**

**EPR: efecto de aumento de la permeabilidad y retención**

**ES: sal de esmeraldina**

**GCh: gonadotropina coriónica humana**

**GPT: enzima transaminasa glutámico-pirúvica sérica**

**H & E: hematoxilina y eosina**

**HCP: hidroxipropilcelulosa**

**IT<sub>50</sub>: índice de teratogénesis**

**IT: inyección intratumoral**

**IV: inyección intravenosa**

**LED: diodo emisor de luz**

**LM2: línea celular de adenocarcinoma mamario murino**

**MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio**

**NIR: región cercana al infrarrojo**

**Nm: nanómetro**

**NMP: N-metil-2-pirrolidona**

**NOEC: concentración que no provoca efectos**

**NP-TiSiO<sub>4</sub>: nanopartículas de silicato de titanio**

**Np-PANI 1: nanopartículas de polianilina dispersadas en PVP 2%**

**Np-PANI 2: nanopartículas de polianilina dispersadas en PVP 1% + PNIPAM 1%**

**Np-PANI: nanopartículas de polianilina**  
**PANI: polianilina**  
**PII: índice de polidispersión**  
**PNIPAM: poli-n-isopropilacrilamida**  
**PVP: polivinilpirrolidona**  
**ROS: especies reactivas del oxígeno**  
**S.2 – S4: estadios de 2 a 4 blastómeros**  
**S.25: estadio 25 de desarrollo larval**  
**SDS: dodecilsulfato sódico**  
**SEM: microscopia electrónica de barrido**  
**SPR: resonancia del plasmón superficial**  
**TEM: microscopia electrónica de transmisión**  
**TFD: terapia fotodinámica**  
**TFT: terapia fototérmica**



## RESUMEN

La implementación de la nanotecnología en la medicina promete avances importantes, principalmente en las terapias anticancerígenas. En particular, ha atraído mucho la atención en los últimos años, el desarrollo de nanopartículas capaces de generar eficientemente calor bajo iluminación con radiación láser. Esto debido a la posibilidad de controlar la selectividad de nanopartículas en los tumores, que permite una gran localización del calor en el área tumoral a bajas intensidades de luz. Como también mediante la implementación de longitudes de onda de láser específicas, que se encuentran en las llamadas ventanas biológicas, donde los tejidos, parcialmente, se convierten transparentes debido a una reducción simultánea en la absorción y dispersión de fotones con la consiguiente minimización del daño en el tejido sano circundante.

En el presente trabajo se evaluó el potencial fototérmico de nanopartículas de polímeros conjugados a partir de polianilina (PANI), un polímero conductor. Para lo cual, se caracterizaron fisicoquímicamente nanopartículas de PANI estabilizadas con polímeros anfifílicos para posteriormente evaluar la capacidad de inducir hipertermia luego del tratamiento fotoasistido. Conjuntamente, se evaluó la capacidad de incorporación como la biocompatibilidad y toxicidad de Np-PANI en distintas líneas celulares tumorales y normales, estadios embrionarios y larvales de *R. arenarum* y ratones Balb/c. La estabilidad coloidal de estos materiales en medios fisiológicos se relacionó con su capacidad para incorporarse en las células tumorales y sensibilizarlas luego de la iluminación NIR.

Las nanopartículas de polianilina provocaron la muerte celular por apoptosis y necrosis en la línea celular tumoral LM2 luego del protocolo terapéutico fotoasistido ensayado tanto en modelos de cultivos 2D como 3D (esferoides). Las Np-PANI 1 resultaron ser más eficientes que las Np-PANI 2 en lograr la muerte celular a iguales tiempos de incubación y dosis de luz.

En modelos toxicológicos *in vivo* (AMPHITOX y ratones Balb/c) se determinó la inocuidad de Np-PANI en las concentraciones ensayadas para la TFT como también una incorporación dependiente del tamaño de las nanopartículas. En ratones Balb/c, con tumores implantados de la línea celular LM2, se logró la ablación tumoral por TFT con las Np-PANI 1 inyectadas dentro del tumor y con una dosis de luz equivalente a los ensayos *in vitro*. El 60 % de los animales tratados mostraron regresión total de los tumores con buena tolerancia a la terapia.

Los resultados obtenidos proponen a las Np-PANI como interesantes nanoobjetos fototérmicos para ser implementados en el tratamiento de enfermedades tumorales.

**ABSTRACT**

The application of nanotechnology in medicine promises substantial advances, particularly in anticancer therapies. In particular, the recent development of nanoparticles that can efficiently generate heat under illumination with laser radiation has attracted much attention in recent years. This is due to the ability to control the selectivity of nanoparticles in tumors, which allows a heat targeting tumor area at low light intensities. Moreover, by implementing wavelengths of specific laser light in the so-called biological windows, where the tissue partially become transparent due to a simultaneous reduction in the absorption and scattering of photons with the subsequent decrease in damage surrounding healthy tissue.

In this work the potential photothermal activity of conjugated polymer nanoparticles based on polyaniline (PANI), a conductive polymer, was evaluated. First, PANI nanoparticles stabilized with amphiphilic polymers were characterized and subsequently evaluated by its ability to induce hyperthermia after illumination treatment. Furthermore, the ability of incorporation as well biocompatibility of PANI-Np was evaluated in different tumor and normal cell lines, embryonic and larval stages of *R. arenarum* and Balb/c mice. The colloidal stability of these nanoobjects in physiological media was associated with their ability to incorporate into tumor cells and sensitize them after NIR irradiation.

Polyaniline nanoparticles caused cell death by apoptosis and necrosis in LM2 tumor cell line after photothermal treatment in both 2D and 3D cell cultures. Np-PANI 1 were more efficient than Np-PANI 2 in achieving cell death at equal incubation times and light dose.

In the other hand, *in vivo* toxicological models (AMPHITOX and Balb/c mice) supported the innocuousness of PANI-Np in concentrations used for *in vitro* PTT. In addition, size-dependent incorporation and concentration-dependent lethal and sublethal effects were found in larval and embryonic stages of *R. arenarum*.

In balb/c tumor model, ablation was achieved with PANI-Np 1 injected into the tumor and a light dose equal to *in vitro* assays. 60% of treated animals showed complete regression of tumors with good tolerance to therapy and without any evidence of recurrence for a prolonged period of time (3 months).

These results highlight PANI-Np as interesting photothermal nanoobjects to be implemented in the treatment of tumor diseases.





## RESUMO EXPANDIDO

O câncer é um importante problema de saúde pública e é a segunda causa de morte em seres humanos em todo o mundo depois das doenças cardiovasculares. A incidência e mortalidade por câncer se elevam à medida que a população cresce, e que a expectativa de vida das pessoas e a exposição aos fatores de risco aumentam. Por tudo isso, se está trabalhando com determinação e vigor na busca de novas terapias, como também no melhoramento das já existentes.

A nanotecnologia é uma ciência e um avanço tecnológico que explora e investiga os fundamentos e as propriedades da matéria com dimensões na ordem de nanômetros. Isso envolve a capacidade de modificar, controlar e explorar as propriedades elétricas e físico-químicas que emergem das partículas que operam a nível dos átomos e moléculas, que variam de 1 nm a 100 nm. A aplicação da nanotecnologia na medicina promete avanços significativos, principalmente em terapias anticâncer. Em particular, tem atraído muita atenção nos últimos anos, o desenvolvimento de nanopartículas que podem gerar calor de forma eficiente sob iluminação com radiação laser. O uso da luz se assemelha ao da hipertermia, utilizada ainda na antiguidade para tratamentos antitumorais. O desafio das últimas décadas está focado na combinação destes tratamentos através do desenho de nano-objetos. É aqui que nasce a terapia foto térmica (TFT) como uma modalidade terapêutica, ainda em fase experimental para o tratamento do câncer. Essa terapia envolve a utilização de nanomateriais com efeito tóxico nulo na escuridão, e que, na presença de luz, a absorvem e geram calor, provocando a morte de células tumorais. Isto pode ser conseguido devido à possibilidade de controlar a acumulação de nanopartículas no tumor, o que permite uma grande concentração de calor na área de localização do tumor a baixas intensidades de luz. Como também através da aplicação de luz na região do infravermelho próximo (NIR), região considerada uma janela terapêutica, onde os tecidos tornam-se parcialmente transparentes, devido a uma redução simultânea na absorção e dispersão de fótons com consequente aumento da penetração da luz.

Diferentes nanomateriais fototérmicos estão sendo estudados para o tratamento de tumores por TFT. Entre eles, os mais estudados são nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono. O maior problema com estes nanomateriais reside na falta de biocompatibilidade com efeitos tóxicos, resultado da avaliação in vivo dos mesmos.

Outro grupo importante de nanomateriais que podem ser utilizados em TFT e são objetos de estudo nessa tese são aqueles à base de polímeros semicondutores orgânicos. Polímeros semicondutores são macromoléculas constituídas por uma cadeia central que contém uma série de átomos ligados entre si por uma sucessão de ligações simples e duplas (ou triplas) alternadas ao longo da cadeia. Esta estrutura molecular confere ao material características únicas, tais como uma boa condutividade elétrica (em relação a outros materiais orgânicos) e excelente processabilidade mecânica. Polímeros semicondutores tais como polianilina (PANI) foram desenvolvidos e estudados para diversos fins, tais como materiais biomédicos, aplicações em engenharia de tecidos e biossensores. O grande interesse por este polímero é devido à sua propriedade eletroquímica única, as propriedades químicas e físicas, a condutividade elétrica, a estabilidade no meio ambiente e sua biocompatibilidade.

Neste trabalho, os efeitos fototerapêuticos e tóxicos de um novo nanomaterial derivado do polímero semicondutor polianilina com aplicação em terapia fotoassistida contra o câncer foram avaliados. Para isso, utilizou-se os seguintes objetivos:

**1. Caracterizar e selecionar nanopartículas biocompatíveis de polímeros condutores para uso em TFT:** Para isso, caracterizou físico-quimicamente nanopartículas de PANI estabilizadas estericamente com polímeros anfífilos. A polianilina é solúvel apenas em alguns solventes e não em água. Para ultrapassar este inconveniente e, assim, estender a utilidade do polímero em aplicações biológicas, utilizou-se polímeros como a polivinilpirrolidona (PVP) e a poli-n-isopropilacrilamida (PNIPAM) para conseguir o efeito estérico nas referidas nanopartículas. Estes polímeros foram escolhidos devido a biocompatibilidade dos mesmos. Utilizando o método descrito por Stejskal, et al. conseguiu-se sintetizar nanopartículas de PANI com 2% de PVP (Np-PANI 1) com 1% de PVP + 1% PNIPAM (Np-PANI 2). A caracterização físico-química por SEM, TEM e espalhamento dinâmico de luz (DLS) determinou um tamanho médio de partícula para Np-PANI 1 de 200 nm com um índice de polidispersão (IdP) e 0,145 e para Np-PANI 2 de 90 nm e IdP de 0,082.

Np-PANI 1 acabou por ser esférica enquanto Np-PANI 2 mostrou uma forma mais irregular. A análise de potencial Zeta determinou que ambos os tipos de dispersões têm uma carga de superfície neutra (-7,58 mV para Np-PANI 1 e -6,07 mV para Np-PANI 2). Além disso, avaliou-se a capacidade fototérmica que as nanopartículas possuem em uma solução aquosa. Após iluminação com um laser NIR de 785 nm de comprimento de onda

e uma fonte regulada a 500 mW / cm<sup>2</sup>, comprovou-se um aumento de temperatura dependente da concentração de nanopartículas como o tempo de iluminação das soluções alcançando em alguns casos  $\Delta T$  12 ° C.

**2. Avaliar a citotoxicidade na ausência de luz e o efeito fototerapêutico destas nanopartículas em linhagem de células tumorais em modelos de cultivo 2D e 3D (monocamada e esferóides):** Avaliou-se tanto a capacidade de incorporação quanto a de biocompatibilidade e a toxicidade de Np-PANI em distintas linhagens celulares tumorais e normais. A estabilidade coloidal destes materiais em meios fisiológicos foi associada com a sua capacidade de incorporação em células tumorais e sensibilizá-las após a iluminação NIR. As dispersões de nanopartículas obtidas tentaram ser incorporadas de forma eficiente em células tumorais de linha celular LM2. A captação celular atingiu um patamar em tempos curtos de incorporação de mecanismos ativos envolvendo internalização celular. Nanopartículas de polianilina causaram a morte celular por apoptose e necrose na linhagem de células tumorais LM2 após tratamento com protocolo fotoassistido testado em modelos tanto em 2D e 3D culturas (esferóides). Este protocolo consistiu na incubação com Np-PANI durante 3 horas e, em seguida, na iluminação das células durante 15 minutos com uma fonte de laser de luz NIR (785 nm e 500 mW / cm<sup>2</sup>). Além disso, Np-PANI 1 foram mais eficientes que Np-PANI 2, ao atingir a morte celular em concentrações semelhantes, tempos de incubação e doses de luz utilizada.

**3. Determinar a toxicidade dos nanomateriais *in vivo*, avaliando a atividade embriotal das nanopartículas através do teste AMPHITOX, em embriões e larvas de *Rhinella arenarum*:** As concentrações de segurança de Np-PANI testados in através do software estatístico PROBIT uma NOEC de exposição para Np-PANI 1 de 0,9 mg / ml e Np-PANI 2 de 0,5 mg / ml na fase larval S.25. Esta diferença foi atribuída ao menor tamanho da Np PANI 2 e, por conseguinte, a um aumento da acumulação e toxicidade desta dispersão de nanopartículas. As Np-PANI foram localizadas principalmente no intestino das larvas e o efeito tóxico pode ser atribuído aos danos produzidos nestes órgãos. Por outro lado observou-se um efeito teratogênico em estágios embrionários de *R. arenarum* logo depois da exposição a ambas dispersões de nanopartículas. No que diz respeito ao Np PANI-1 este efeito foi atribuído a proporção utilizada do polímero dispersante PVP para estabilizar as nanopartículas. Este efeito foi diminuído quando se avaliou a exposição a Np-PANI 2, ao qual se deve a diminuição na proporção de polímero estabilizante PVP como também pela presença de um segundo polímero PNIPAM



utilizado na síntese. A partir destes resultados, foram escolhidos as Np-PANI 1 como as melhores candidatas para prosseguimento de estudos em camundongos devido ao menor efeito tóxico e aos maiores efeitos fototerapêutico.

#### **4. Realizar estudos toxicológicos de Np-PANI em camundongos Balb / c:**

Mediante a inoculação de Np-PANI 1 por via endovenosa nos animais depois de diferentes períodos de tempos (1,3 e 7 dias), avaliou-se parâmetros sanguíneos como creatinina, uréia e GPT. Estes parâmetros refletem a funcionalidade de depuração de órgãos (fígado e rim) a xenobióticos. Eles estavam dentro da faixa normal para a espécie e não houve diferenças significativas com o resto dos grupos controles. Estes resultados mostram a toxicidade nula de Np-PANI 1 no que diz respeito à funcionalidade destes órgãos.

**5. Avaliar o efeito antitumoral do TFT in vivo, como também a tolerância na terapia:** Para isso implementou-se um modelo tumoral em camundongos Balb / c injetando células de tumor da linhagem celular LM2 na região do flanco dos animais. Mediante ensaios histopatológicos e coloração com corante vital (azul de Evans) determinou-se a morte celular por apoptose e necrose em 24 horas nos tumores dos ratinhos tratados com a combinação de nanopartículas e luz. Posteriormente, o crescimento do tumor ao longo do tempo foi avaliado pós TFT. A ablação do tumor por TFT foi conseguida com Np-PANI 1 injetada no interior do tumor e uma dose de luz equivalente aos ensaios *in vitro*. 60% dos animais tratados apresentaram regressão completa dos tumores em sete dias pós-terapia, sem evidência de recidiva por mais de três meses de acompanhamento dos animais. Além disso, a fim de avaliar a tolerância ao TFT, analisou-se secções histológicas de tecido do baço, fígado e rim pós TFT e em todas as amostras se observou uma arquitetura conservada sem evidencias de efeitos tóxicos. Estes resultados foram confirmados por análise bioquímica de parâmetros sanguíneos relacionados com a funcionalidade de tais órgãos.

Os resultados obtidos propõem as Np-PANI 1 como interessantes nanoobjetos fototérmicos a ser implementados no tratamento de doenças tumorais através de terapia fototérmica.

# Introducción

## INTRODUCCIÓN

### ***1. Nanotecnología***

La nanotecnología es la ciencia y desarrollo tecnológico que explora e investiga los fundamentos y propiedades de la materia con dimensiones del orden de los nanómetros. Esta involucra la capacidad de modificar, controlar y explotar las propiedades físico-químicas y eléctricas que emergen de las partículas que operan a nivel de átomos y moléculas, abarcando desde 1 nm hasta 100 nm<sup>1</sup>. El nanómetro equivale a 10<sup>-9</sup> metros, es decir, una milmillonésima parte de un metro (figura 1). Este concepto no es estricto, sino que está en constante evolución y la definición de lo que abarca la escala nanométrica varía de acuerdo a la legislación de los distintos países. Según la National Nanotechnology Initiative (USA) los materiales son considerados nanomateriales cuando se encuentran dentro del orden de 1 a 100 nm de tamaño y presentan propiedades distintas del material en granel del cual derivan. De acuerdo a la Comisión Europea; se define nanomateriales como aquellas partículas en estado no ligado, aglomerado y/o agregado entre las cuales el 50% o más de las partículas presentan una de sus dimensiones en escala de 1 a 100 nm. Por otro lado, la Agencia de Medicinas Europeas amplía este rango a materiales con tamaños menores a 1000 nm que son utilizados por presentar propiedades específicas interesantes.

Los materiales en nanoescala permiten que emerjan nuevas propiedades que no son posibles o no son exhibidas por los átomos individuales, moléculas y/o los materiales en escala macroscópica. Éstas incluyen diferentes propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas, mecánicas, térmicas, físico-químicas, aumento del área específica (área/volumen), entre otras<sup>1-4</sup>. En términos generales, los materiales en nanoescala son más reactivos, debido a que una proporción mayor de átomos o moléculas del material son superficiales y pueden reaccionar con el medio circundante. La interacción entre los componentes del cuerpo humano y los materiales, estructuras o dispositivos creados mediante la Nanotecnología abre las puertas a nuevas posibilidades en medicina. Estas características han permitido una gran diversidad de aplicaciones en el campo de la tecnología actual y, en concreto, en la medicina, lo que ha dado lugar a la aparición de un nuevo campo llamado nanomedicina<sup>5-7</sup>.

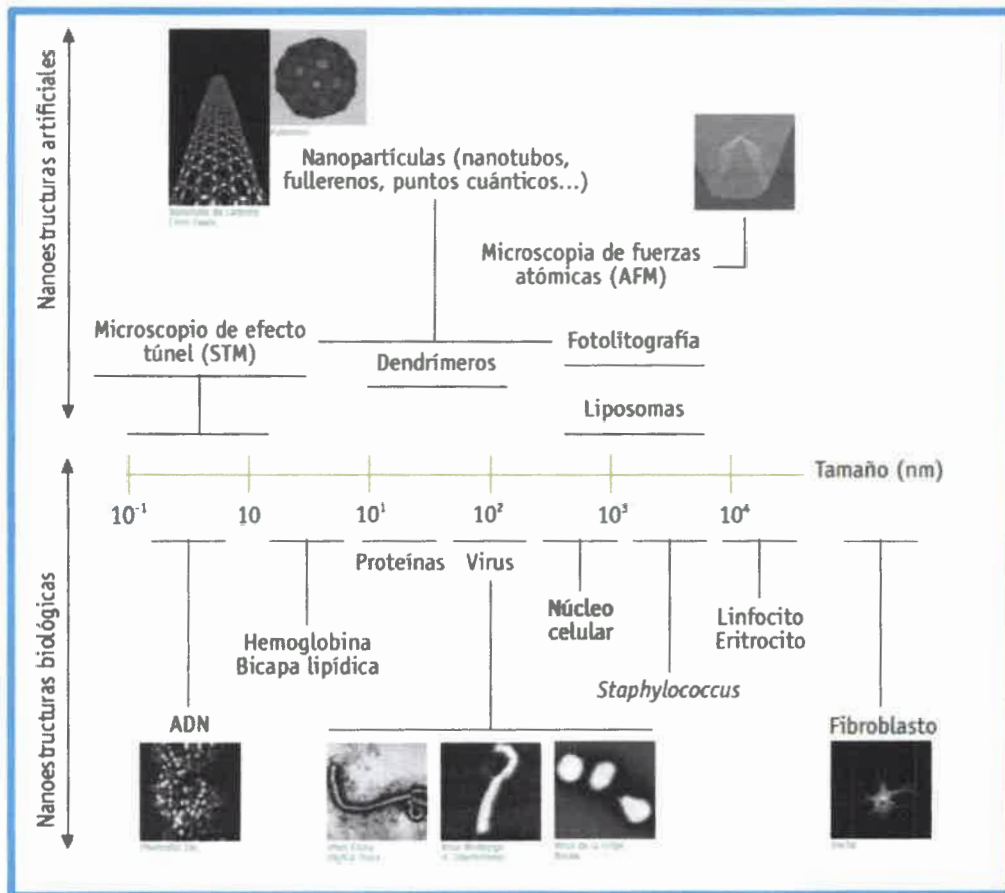


Figura 1: Nanoestructuras artificiales y biológicas. Figura tomada y adaptada de la referencia 8.

### 1.1. Nanomedicina

La nanomedicina es la rama de la medicina que aplica los conocimientos de nanotecnología en las ciencias y procedimientos médicos. La nanomedicina tiene como objetivo el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades área que aún se encuentra en estados poco avanzados o en el inicio de su desarrollo. La nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos (o nanoterapia) y la medicina regenerativa.

El nanodiagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades en los estadios más tempranos posibles, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>9-11</sup>. La nanoterapia pretende dirigir nanosistemas activos que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos dirigidos a las células dianas o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios<sup>12,13</sup>. La medicina regenerativa tiene como objetivo



la reparación o sustitución de tejidos y órganos dañados; la nanotecnología introdujo una serie de materiales con potenciales aplicaciones en esta área de investigación<sup>14,15</sup>.

Una de las aplicaciones más notorias y potencialmente más inmediatas y prometedoras de los nanomateriales es en el campo de diagnóstico de enfermedades en etapas más tempranas, nuevas modalidades terapéuticas y la prevención de enfermedades, tales como el cáncer<sup>16,17</sup>.

La erradicación del cáncer representa el mayor desafío en medicina y optimizar terapias requiere de innovar y adoptar nuevas modalidades que aseguren mejor calidad de vida y regresión total del tumor.

## ***2. Cáncer***

La multiplicación y proliferación de las células esta cuidadosamente regulada y responde a necesidades específicas del organismo. Cuando estos controles se ven alterados, las células son capaces de proliferar descontroladamente sin responder a las necesidades del organismo y el resultado es la generación de un clon capaz de expandirse de forma indefinida, formando una masa a la que denominaremos tumor (figura 2).

Algunos tumores no son invasivos y están separados del tejido normal por una capsula de tejido conectivo, se los denomina tumores benignos. Pero cuando estas células adquieren capacidad de invadir al tejido circundante o de desprenderse del tejido que le dio origen y colonizar un nuevo tejido (metástasis), se transforman en tumores malignos<sup>18,19</sup>.

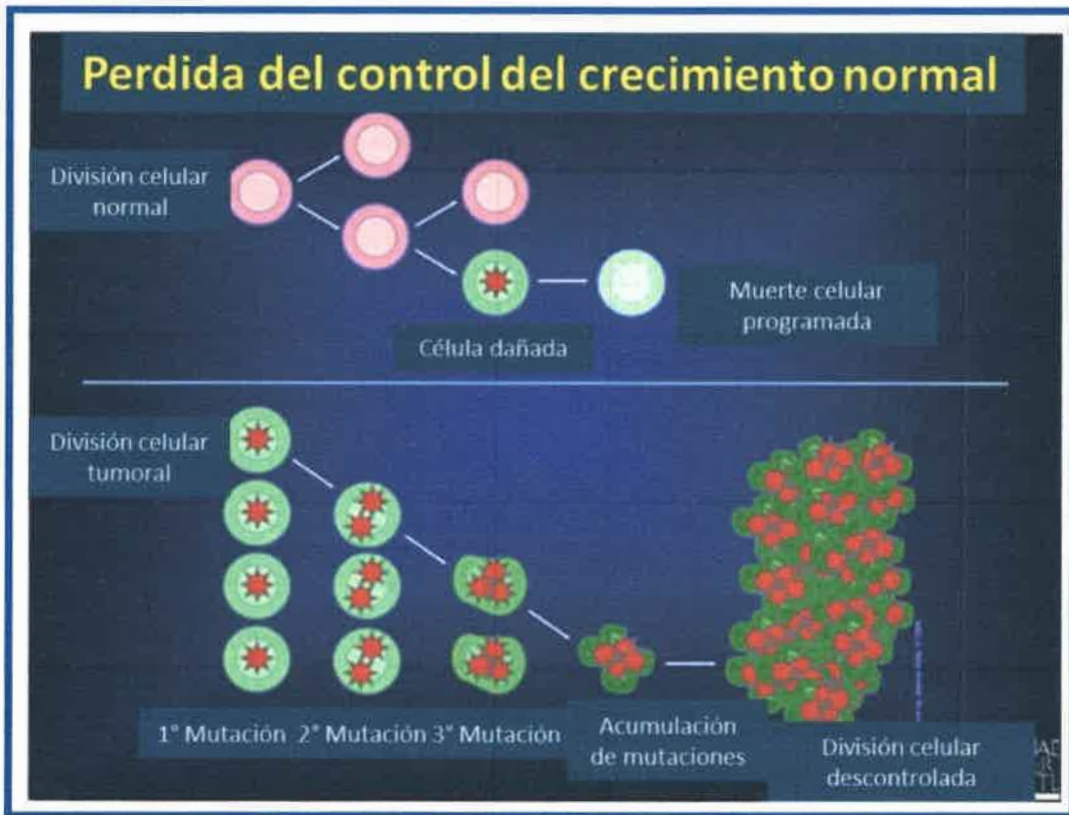


Figura 2: Formación de una masa tumoral. Figura tomada y adaptada de la referencia 20.

### 2.1. Patogenia del cáncer

El cáncer es el resultado fenotípico final de una serie de eventos genéticos y no genéticos que se puede desarrollar a lo largo de un periodo de tiempo. El motivo de esta afirmación, es que existen pocas causas individuales de desarrollo de cáncer. En concordancia, la aplicación de un agente productor de cáncer (carcinógeno) en un tejido no necesariamente llevará a la inmediata producción de células cancerígenas; pero si provocará la iniciación de una cascada de eventos denominada carcinogénesis<sup>21</sup>. Este proceso tendrá como consecuencia una acumulación de mutaciones somáticas sucesivas sobre una misma célula, que la llevará a adquirir nuevas habilidades y por lo tanto, poseer una ventaja competitiva con respecto a las células vecinas<sup>22</sup>. La carcinogénesis, entonces es el proceso de transformación de las células normales en células cancerosas. Las mutaciones en los genes reguladores claves del ciclo celular alteran el estado de las células y pueden causar el crecimiento irregular que se observa en el cáncer<sup>23</sup>. Las etapas del proceso de carcinogénesis son las siguientes (figura 3):

La primera etapa se denomina **iniciación**, en la cual un cambio en el material genético de la célula la prepara para transformarse en cancerosa. Dicho cambio



irreversible es causado por un agente llamado carcinógeno, entre los que se encuentran productos químicos, virus o radiaciones. En la iniciación del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes, los protooncogenes y los genes supresores de tumores. En sus versiones normales, controlan el ciclo celular, esto es, la compleja secuencia de eventos que hacen que una célula crezca y se divida.

Los protooncogenes, cuando mutan pueden convertirse en oncogenes carcinogénicos capaces de dirigir una multiplicación desenfrenada. Muchos de estos genes codifican para factores de crecimiento o receptores de los mismos. Las mutaciones pueden cambiar la estructura del protooncogen y hacer que produzca un exceso de proteína estimuladora del crecimiento. Esto conduce a la síntesis de un producto genético anormal de función aberrante, lo que determina la producción facilitada o inapropiada de una proteína promotora del crecimiento, estructuralmente normal pero en exceso<sup>24</sup>. Además estos genes pueden codificar para receptores aberrantes que liberan en el citoplasma celular un torrente de señales proliferativas, aunque no estén presentes los factores de crecimiento que induzcan a la célula a replicarse<sup>25</sup>.

Los genes supresores de tumores, son genes cuyos productos actúan como frenos celulares y por lo tanto inhiben la proliferación celular, cuando las mutaciones los anulan contribuyen al proceso carcinogénico. La falta de proteína supresora funcional priva a la célula del freno que, en situación de normalidad, impide el crecimiento desmesurado. Los productos de estos genes alterados actúan sobre células cercanas, y además lo cual es importante pueden provocar también la proliferación de la propia célula que los fabrica<sup>26</sup>.

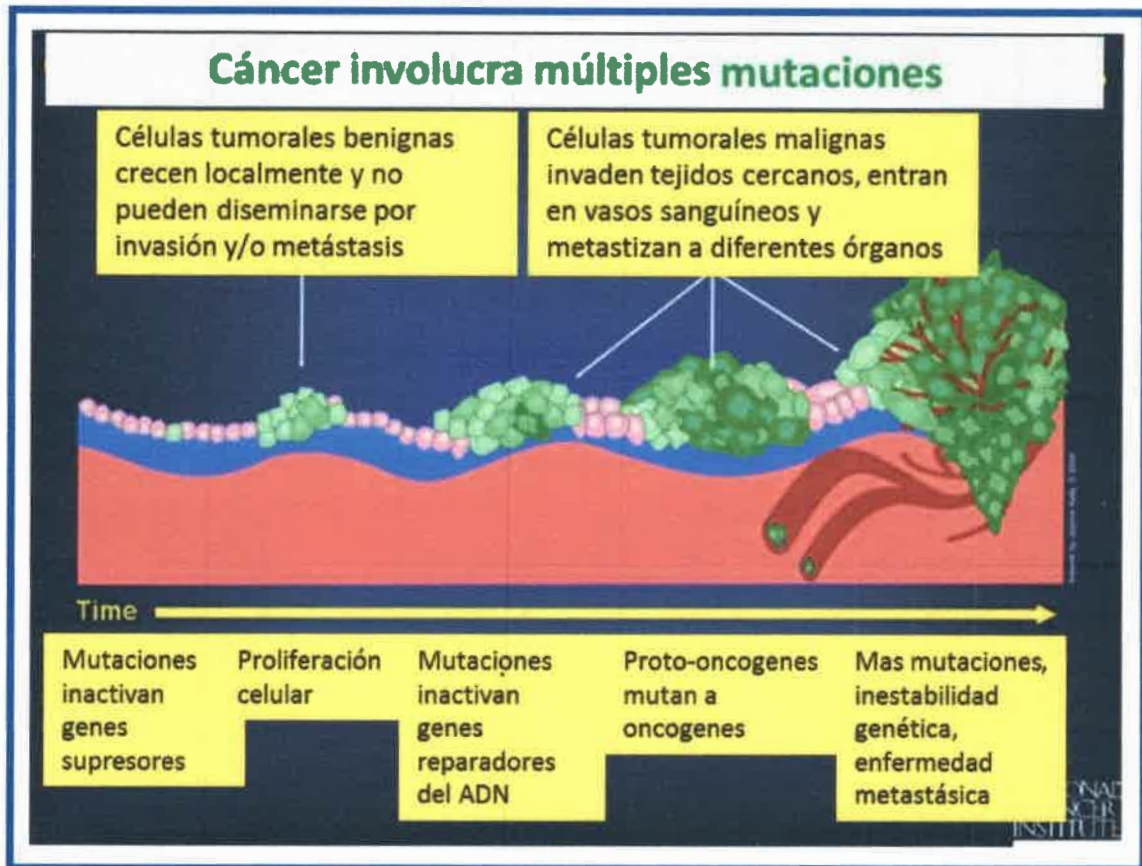


Figura 3: Etapas del proceso de carcinogénesis. El Proceso de carcinogénesis involucra múltiples mutaciones que diferencian tumores benignos de malignos. Imagen tomada y adaptada de la referencia 20.

La siguiente etapa es la **promoción** del tumor que consiste en la multiplicación de las células transformadas, es decir su expansión clonal, lo que ocurre dentro de lesiones preneoplásicas o precancerosas. La promoción puede ser producida por el carcinógeno que dio origen a la iniciación o por otras sustancias denominadas agentes promotores, los cuales introducen mutaciones adicionales. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos desprendidos en la combustión de cigarrillos y tabacos, representan un ejemplo de elementos exógenos muy ricos tanto en agentes iniciadores como en promotores, razón por la cual han sido empleados en modelos experimentales de carcinogénesis<sup>27</sup>.

La etapa de **progresión** consiste en la aparición visible del tumor maligno. Ocurre una evolución clonal de las células transformadas y surgen secuencialmente subpoblaciones clonales, con un aumento de la inestabilidad genética capaz de crear un estado metastático.



## **2.2. Características de las células tumorales**

En el 2011, Douglas Hanahan y Robert Weinberg definieron las propiedades de las células tumorales<sup>28</sup>. Entre las nuevas propiedades que adquieren las células tumorales podemos citar:

➤ **Mantenimiento de la señal proliferativa:** debido a que son capaces de producir factores de crecimiento ligandos propios (proliferación autócrina), y que pueden mandar señales para estimular a las células vecinas del estroma tumoral, con el fin de obtener otros factores de crecimiento<sup>29,30</sup>. Además al tener receptores alterados en la superficie celular para factores de crecimiento, pueden desencadenar la respuesta proliferativa independientemente de los factores de crecimiento.

➤ **Insensibilidad frente a señales inhibitorias de proliferación:** mediante la inactivación de genes supresores de tumores tales como p53 y retinoblastoma (RB) como así también por la insensibilidad frente a la inhibición del crecimiento por contacto, que caracteriza a las células normales<sup>31</sup>.

➤ **Evasión de la muerte celular:** el concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera para el desarrollo del cáncer ha sido establecido por diferentes estudios a lo largo de las últimas décadas<sup>32-34</sup>. La apoptosis se desencadena en respuesta a situaciones de estrés que las células cancerosas experimentan durante el proceso de carcinogénesis. Algunas células tumorales tienen la capacidad de evadir este proceso por varios mecanismos, el más común es la pérdida de funcionalidad del gen supresor de tumores p53, que puede inducir apoptosis ante un daño crítico del ADN. Otros mecanismos propuestos son el aumento de expresión de proteínas reguladoras antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl) o de señales de supervivencia (Igf 1/2); o por interrupción de la vía extrínseca apoptótica dependiente de ligando.

➤ **Potencial replicativo ilimitado:** es bien aceptado que para poder generar masas tumorales macroscópicas, las células tumorales necesitan replicarse ilimitadamente. Esta capacidad la adquieren debido a que poseen la actividad de la enzima telomerasa elevada, la cual mantiene la longitud de los telómeros. Las células normales pierden en cada replicación una porción de los telómeros de los cromosomas debido a limitaciones de la ADN polimerasa. Por lo tanto las células normales solo pueden dividirse una cantidad limitada de veces no así las tumorales<sup>35,36</sup>.

➤ **Angiogénesis:** debido a que los tumores poseen un alto metabolismo y consumen grandes cantidades de nutrientes y oxígeno, sufren de hipoxia. Esta hipoxia estimula la

liberación de factores de crecimiento angiogénicos (BGGF, TGF $\alpha$ , VEGF), que son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos<sup>37-39</sup>. Los nuevos vasos sanguíneos nutren al tumor en crecimiento, permitiéndole aumentar su tamaño y a la vez constituyen una vía que facilita la metástasis.

➤ **Invasión y metástasis:** estos procesos contemplan una serie de cambios biológicos en las células tumorales que permiten la invasión local y a continuación el ingreso de las mismas en el sistema circulatorio y en los vasos linfáticos cercanos. El tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfático y hemático, seguido del escape de las células cancerosas de estos vasos (extravasación) y la penetración en el parénquima de los tejidos distantes, permite la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis). Finalmente, el crecimiento macroscópico de las lesiones micrometastásicas se transforman en tumores, este último paso se llama “colonización”<sup>40,41</sup>.

➤ **Inestabilidad genómica y mutación:** es debido a la adquisición de un genotipo mutante por parte de un clon tumoral, que le conferirá ventaja frente a otras células permitiendo su expansión y dominio en un ambiente tisular local<sup>42,43</sup>.

➤ **Estimulación de una respuesta proinflamatoria:** esto ocurre por parte de las células tumorales que estimulan la respuesta inmune innata. En estas condiciones el sistema inmune es capaz de suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, tales como, factores de crecimiento, factores de supervivencia celular, factores proangiogénicos, enzimas que modifican la matriz extracelular que facilitan la invasión y metástasis<sup>44,45</sup>. Además, las células inflamatorias pueden liberar especies reactivas del oxígeno que pueden acelerar el proceso de malignidad en las células vecinas<sup>46</sup>.

➤ **Metabolismo celular anómalo:** las células tumorales pueden reprogramar su producción de energía, limitando el metabolismo energético principalmente a través de la glucólisis, aun en presencia de O<sub>2</sub>. El incremento en la glucólisis permite la desviación de productos intermediarios glucolíticos en vías biosintéticas (generación de nucleósidos y aminoácidos), que facilitan la biosíntesis de macromoléculas y organelas, necesarias para la generación de nuevas células cancerosas<sup>47-49</sup>.

➤ **Evasión del sistema inmune:** mediante varios mecanismos que logran convertir a las células tumorales en un fenotipo irreconocible para ser detectado por el sistema inmunitario impidiendo reconocerlas como extrañas y atacarlas<sup>50-52</sup>.

### **2.3. Apoptosis y cáncer**

Para mantener la vida de un organismo se han desarrollado una serie de mecanismos que permiten eliminar aquellas células que ya no son necesarias para el mantenimiento de las funciones vitales o aquellas que pueden representar algún peligro. Uno de estos mecanismos es la apoptosis<sup>53</sup>. La apoptosis es una forma de muerte celular distinta a la necrosis. La necrosis es una forma de muerte accidental, involuntaria y, por este motivo, induce una reacción inflamatoria para poder repararla. Por el contrario, la apoptosis representa una forma de muerte más sutil, una muerte celular programada.

La muerte celular por apoptosis viene regulada a nivel genético de forma directa o indirecta, entre otros mecanismos a través de oncogenes y anti-oncogenes, que a la vez pueden interactuar entre sí. Es la ausencia de un oncogen lo que permite que aquellas células con mutaciones en su genoma se "suiciden". Este es el caso por ejemplo del oncogen bcl-2, un gen anti-apoptosis que se expresa de forma muy intensa en linfomas y diversos tipos de carcinoma<sup>54,55</sup>. Si este protooncogen no se activa, las células "iniciadas" podrán "suicidarse", con lo cual el organismo habrá resuelto el problema. En la mayoría de casos, sin embargo, la apoptosis de una célula mutada se produce gracias a la activación de un gen y es la ausencia de este gen lo que puede fomentar el cáncer. Esto sucede por ejemplo en el caso de los genes RP-2, RP-8, TRPM-2, SGP-2, Fas/APO-1 y p53.

### **2.4. Epidemiología del cáncer**

El cáncer es un importante problema de salud pública y es la segunda causa de muerte en humanos a escala mundial, luego de las enfermedades cardiovasculares. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008. La incidencia de esta enfermedad y su mortalidad se incrementan en el mundo debido al aumento de la población mundial, elevación de la esperanza de vida y a una mayor exposición a los factores de riesgos. La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes); de acuerdo a las estimas realizadas por la IARC para el año 2012 (figura 4). Esta estimación corresponde a la aparición de más de 100.000 nuevos casos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres.



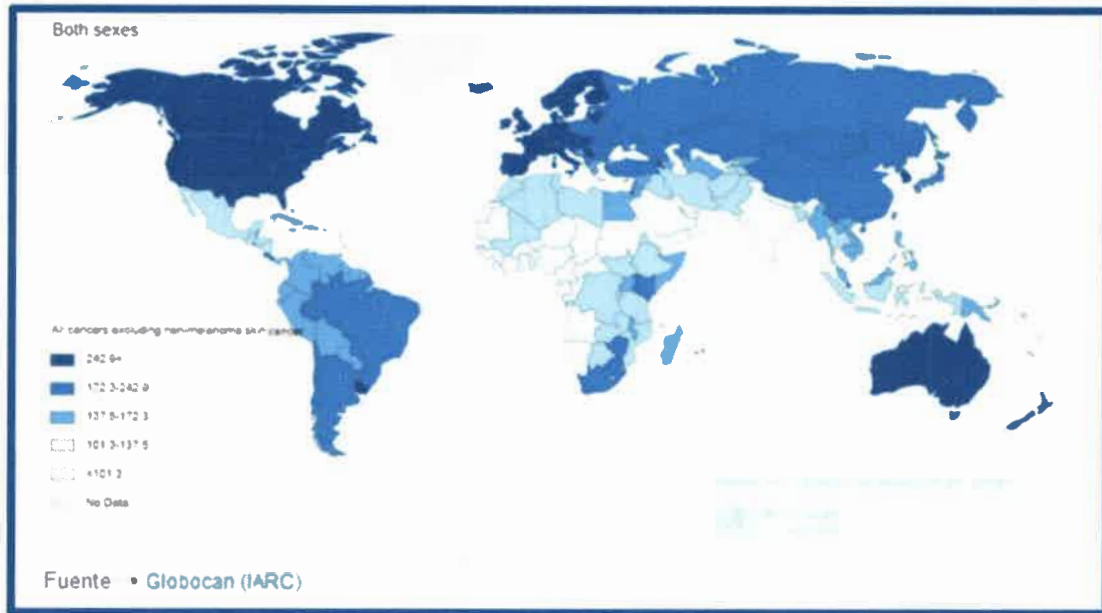


Figura 4: Incidencia de cáncer mundial (2012). La Argentina entre los países de incidencia de cáncer media-alta. Tasas estandarizadas por 100.000 habitantes. Figura tomada de referencia 56.

Los animales de compañía, especialmente perros y gatos, también pueden padecer tumores. Se estima que 1 de cada 3 a 4 perros desarrollarán cáncer (y alrededor de 1 de cada 5 gatos). Los tumores benignos y malignos afectan en total al 1,1% de los perros y al 0,2% de los gatos<sup>57</sup> siendo los lugares de mayor localización en el perro, la piel y el tejido subcutáneo (67,6%); mientras que en el gato, la piel también es asiento frecuente de tumores (44,85%)<sup>58,59</sup>.

La esperanza de vida de las personas a través de mejoras en el control de las enfermedades infecciosas y los avances en la salud pública ha dado lugar a un aparente aumento de las enfermedades relacionadas con la edad como el cáncer y la osteoartritis. Un patrón similar se ha observado en perros y gatos a través de los regímenes de vacunación para enfermedades infecciosas mortales y a los principales avances en la atención veterinaria.

Si bien la lucha contra el cáncer ha avanzado, el desafío del nuevo milenio es eliminar la muerte y el sufrimiento debido a dicha patología. Por lo cual se está trabajando con resolución y contundencia, para impulsar el desarrollo de nuevas terapias o mejorar las ya existentes.

## **2.5. Terapias contra el cáncer**

Para definir la eficacia de una terapia contra el cáncer, se debe tener en cuenta varios aspectos, entre ellos el grado de remoción del tumor (la cura de la enfermedad está sujeta a la remoción total del tumor). Un tratamiento poco eficaz solo disminuye el tamaño de la masa tumoral o no tiene efecto sobre ésta. Un tratamiento eficaz debe dirigirse no solo al tumor primario, sino también a los nuevos tumores que puedan aparecer en otras partes del organismo. Entre las terapias contra el cáncer se encuentran las siguientes:

### **2.5.1. Cirugía**

Es la modalidad más antigua de tratamiento contra el cáncer y sigue constituyendo la herramienta ideal para tratar tumores sólidos. La completa remoción quirúrgica de la masa tumoral localizada, cura la mayoría de los pacientes con cáncer más que cualquier otro tratamiento. Esta modalidad generalmente se aplica para tratar tumores sólidos localizados, de estadios tempranos y con bajo potencial de metástasis<sup>60</sup>.

### **2.5.2. Quimioterapia**

Consiste en la administración de drogas para la destrucción de células cancerosas, dichos medicamentos se denominan citotóxicos. Por lo general, los agentes quimioterapéuticos actúan interfiriendo en los procesos fisiológicos de la proliferación celular y de esta manera impiden la reproducción de células cancerosas. Pueden actuar sobre la síntesis de ADN, ARN y proteínas, como también en los mecanismos de reparación del ADN<sup>61</sup>. La quimioterapia no solo disminuye la masa tumoral primaria sino que también elimina las células tumorales circundantes y metastásicas<sup>62</sup>.

### **2.5.3. Inmunoterapia**

También llamada terapia biológica; es un tratamiento basado en la estimulación del sistema inmunológico del paciente, con el objetivo que éste sea capaz de reconocer y eliminar las células tumorales<sup>63</sup>. Dentro de los tratamientos biológicos están los anticuerpos monoclonales, las vacunas y los denominados factores de crecimiento. El componente principal de la respuesta inmune es el TNF- $\alpha$ , entre otras citoquinas<sup>64</sup>.

Actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios orientados al uso de la terapia génica para hacer que las células tumorales expresen distintos tipos de citoquinas.

Hoy en día esta estrategia aún no es válida en clínica, pues no existe forma de transmitir los genes de interés directa y exclusivamente a las células tumorales.

#### **2.5.4 Terapia génica**

La terapia génica consiste en la inserción de genes funcionales ausentes en el genoma de un individuo<sup>65</sup>. Se realiza en las células y tejidos con el objetivo de tratar una enfermedad o realizar un marcaje. La terapia génica es otra estrategia que en algunos casos ha logrado que el tamaño de tumores sólidos disminuya en un porcentaje significativo<sup>66</sup>. Dentro de la terapia génica se han utilizado diferentes estrategias para matar células tumorales entre las cuales podemos nombrar:

- Aumento de la respuesta inmune celular antitumoral (terapia inmunogénica).*
- Introducción de genes activadores de drogas dentro de las células tumorales o terapia de genes suicidas.*
- Normalización del ciclo celular.*
- Uso de ribozimas y tecnología antisentido o "antisense".*

Para alcanzar un determinado efecto biológico en terapia génica, es necesario introducir de manera eficaz la secuencia génica de interés en la célula diana y conseguir su expresión. Como estrategia para introducir un gen deseado en una célula, se han utilizado vectores que faciliten esta acción. Actualmente, uno de los objetivos principales de la terapia génica es el desarrollo de vectores no virales estables y no tóxicos para transportar material genético a las células dianas. En este aspecto, la nanotecnología ha tenido un auge importante, en el desarrollo de nanomateriales biocompatibles capaces de servir como vehículo de genes.

#### **2.5.5. Terapia hormonal**

Esta terapia aumenta o disminuye la cantidad de ciertas hormonas, limitando así el crecimiento de los tumores que dependen de hormonas o que están inhibidos por la acción hormonal<sup>67</sup>. El mecanismo de estas hormonas para el tratamiento del cáncer no es el mismo que el de los medicamentos quimioterapéuticos convencionales, sino que evitan que la célula cancerosa use la hormona que necesita para crecer o evitan que el cuerpo produzca hormonas. Como ejemplo de estos medicamentos podemos citar:

- Las hormonas antiestrógeno fulvestrant (Faslodex®), tamoxifeno y toremifeno (Fareston®).

- Inhibidores de la aromatasa como anastrozol (Arimidex®), exemestano (Aromasin®), letrozol (Femara®).

### **2.5.6. Radioterapia**

Es un tratamiento localizado para enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa)<sup>68</sup>. El ADN es la molécula diana dañada por esta terapia, provocando roturas en las cadenas a nivel de las uniones fosfodiéster, en el entrecruzamiento entre las hebras de ácido nucleico y proteínas cromosomales y daños significativos a la membrana nuclear.

Dentro de la radioterapia, el uso de radiaciones de baja energía ha dado origen a nuevas terapias alternativas fotoasistidas donde podemos citar a la terapia fotodinámica y a la terapia fototérmica.

### **2.5.7. Terapias fotoasistidas**

El uso de luz para el tratamiento de enfermedades data de la antigüedad. Estas terapias consisten en el uso combinado de compuestos fotosensibilizadores con efecto tóxico nulo en oscuridad, y que, en presencia de luz, se activan y desencadena la muerte de células tumorales selectivamente. Dentro de estas terapias podemos encontrar la terapia fotodinámica basada en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como desencadenantes del daño y muerte celular; y la terapia fototérmica basada en la hipertermia como desencadenante de daño y muerte celular.

#### **2.5.7.1. Terapia fotodinámica**

Constituye una modalidad terapéutica que se emplea principalmente para el tratamiento de tumores pequeños y superficiales en piel y mucosas. Se fundamenta en el uso de compuestos fotosensibilizadores que se acumulan preferentemente en tejidos tumorales. La posterior irradiación del área tumoral con una fuente de luz visible y de una longitud de onda apropiada, ocasiona la formación y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS: reactive oxygen species), principalmente oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2^*$ ) con efecto citotóxico, que conllevan a la muerte selectiva de las células tumorales<sup>69-71</sup> (figura 5).



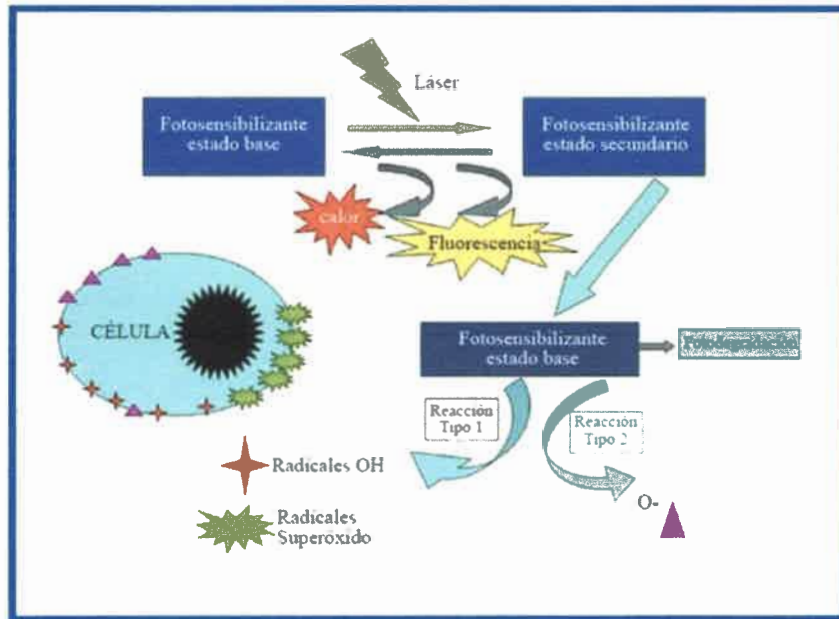


Figura 5: Mecanismo de acción de la Terapia Fotodinámica. Figura tomada y adaptada de la referencia 72.

En resumen, se combinan, tres elementos no tóxicos *per se*: fotosensibilizador, luz y oxígeno, para ocasionar la destrucción de los tejidos tumorales<sup>73</sup>.

Recientemente, los estudios se centraron sobre todo en mejorar la administración de fotosensibilizadores, logrando una mayor solubilidad de aquellos fotosensibilizadores que no son hidrofílicos y también procurando una entrega más directa y localizada en las células dianas<sup>74</sup>. Especialmente se ha hecho hincapié, en el uso de fotosensibilizadores ya existentes combinados con nanopartículas, lo cual dio camino a la Nanomedicina en esta área de investigación<sup>70,75-77</sup>.

### 3. Terapia fototérmica

La terapia fototérmica consiste en el uso experimental de la radiación electromagnética (más a menudo en forma de rayos infrarrojos) en combinación con la hipertermia para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. La terapia fototérmica se basa en la aplicación de un nanomaterial que presenta la particularidad de absorber radiación en el espectro del infrarrojo cercano NIR (NIR, del inglés Near Infrared Region) y luego liberarla como energía vibracional (calor). El calor es el elemento de la terapia que mata a las células diana (figura 6).

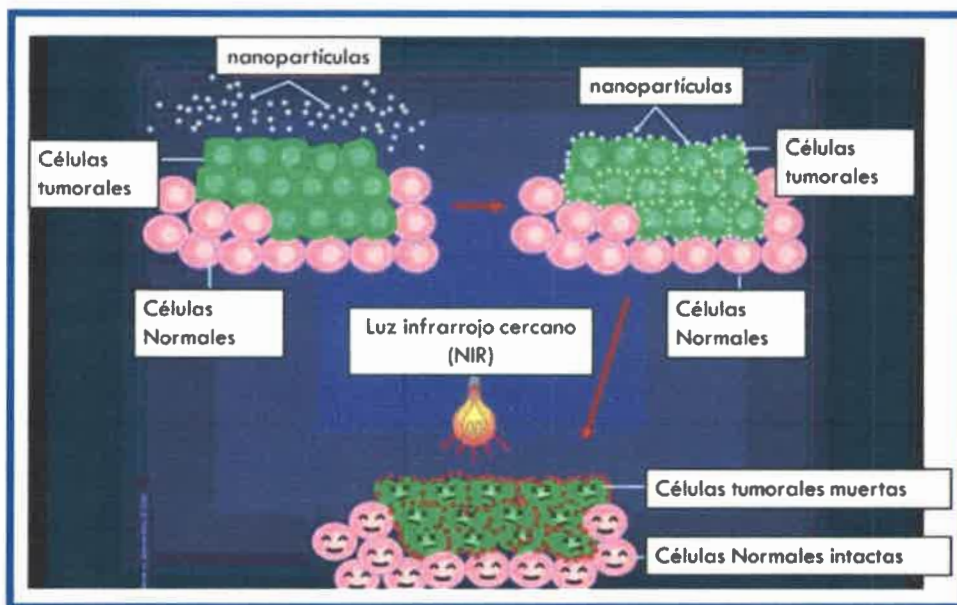


Figura 6: Terapia fototérmica sobre células tumorales. Figura tomada y adaptada de

El tratamiento térmico de las células cancerosas mediante la aplicación del calentamiento local a 70 °C y la hipertermia general (calentamiento a 41-47 °C) se conoce desde el siglo XVIII<sup>78,79</sup>. Sin embargo, los métodos de calentamiento y tecnologías de medición de temperatura no estaban suficientemente avanzados en ese momento, por lo que el éxito y la reproducibilidad de tales tratamientos se redujeron. Como consecuencia, la aplicación clínica de estas terapias no se pudo concretar con éxito. El calor como una modalidad terapéutica ha sido explorado en el cáncer por muchos investigadores<sup>80-84</sup>. El interés en los tratamientos térmicos se reactivó en la década de 1980, cuando los diferentes institutos y sociedades se centraron en el desarrollo y entendimiento de nuevas terapias térmicas. En las últimas décadas, la publicación de varios trabajos científicos que demostraron mejoras sustanciales en los resultados del tratamiento del cáncer mediante el uso de tratamientos térmicos llevó a un renovado interés en la terapia térmica<sup>85-87</sup>. De hecho, la hipertermia se utiliza actualmente como terapia adyuvante a la radioterapia y/o quimioterapia. Un incremento moderado de temperatura aumenta el flujo sanguíneo en el tumor lo que permite que la quimioterapia ejerza un mayor efecto sobre las células cancerosas. Al deprimir la actividad metabólica de las células, el calor también reduce su demanda de oxígeno, lo que aumenta el nivel del mismo en el tumor, convirtiendo a la hipertermia en uno de los más potentes radiosensibilizadores existentes<sup>80</sup>.



Para alcanzar el propósito del tratamiento térmico de tumores (basado ya sea en la ablación térmica o hipertermia), es necesario inducir un calentamiento bien localizado, de modo de conseguir un aumento significativo de temperatura en el tumor, mientras se mantiene la temperatura del tejido circundante en un nivel normal. Durante los últimos años, un gran esfuerzo se ha puesto en marcha, no sólo en el desarrollo de nuevas técnicas para alcanzar el calentamiento controlado y localizado, sino también en lograr el entendimiento de los mecanismos en las bases de los cambios celulares y de la muerte celular inducida por la hipertermia. Una ventaja de utilizar hipertermia para matar las células tumorales, es que los tejidos o células normales por lo general son menos susceptibles a alta temperatura que los tejidos cancerosos<sup>88-90</sup>. En el microambiente tumoral, esta susceptibilidad a altas temperaturas por parte de las células cancerosas está determinada por la fisiología tumoral. La arquitectura de la vasculatura en tumores sólidos es desorganizada y caótica, además por tener un flujo sanguíneo disminuido se generan regiones hipóxicas y de bajo pH, lo que no sucede en tejidos normales. La combinación de bajo pH, baja presión de O<sub>2</sub>, y la falta de glucosa y otros nutrientes tiende a aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la elevación de la temperatura<sup>82,91,92</sup>.

### *3.1. Efectos biológicos de la terapia fototérmica*

Hasta el momento se ha descrito que la hipertermia posee la capacidad de inhibir el crecimiento y/o provocar la muerte celular de células tumorales, tanto por sí misma como por una modalidad de tratamiento adyuvante. Sin embargo, el mecanismo de acción exacto no ha sido dilucidado. Lo que se ha demostrado es que la temperatura y la duración del tratamiento térmico juegan un papel muy importante en lograr los efectos biológicos. Los eventos celulares específicos que suceden frente a la hipertermia, se han descrito por diversos autores y pueden enumerarse cronológicamente de acuerdo a los rangos de temperaturas alcanzados (figura 7). Dentro de estos eventos podemos mencionar; la expresión de proteínas de shock térmico (HSP, del inglés Heat Shock Proteins)<sup>93</sup>; el desarrollo de mecanismos que invierten la resistencia a multidrogas (MDR, del inglés Multidrug resistance)<sup>94</sup> y la muerte celular por apoptosis y/o necrosis<sup>95-97</sup>, todos eventos dependiente de la temperatura.

Si se eleva la temperatura lo suficiente para causar la muerte celular inmediata, en gran medida a través de necrosis por coagulación con daño irreparable de las proteínas y otras macromoléculas biológicas, el término más exacto a utilizar es la termoablación.

En contraste con la termoablación, la hipertermia se refiere a aumentos de temperatura más pequeñas, por lo general dentro del rango de 40-45 °C, que inician una serie de acontecimientos subcelulares, permitiendo que las células sean susceptibles a diversas formas de daño, incluyendo la apoptosis. Se ha informado en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que la generación de hipertermia posee la capacidad de matar células tumorales o de inhibición su crecimiento<sup>92,98-100</sup>.

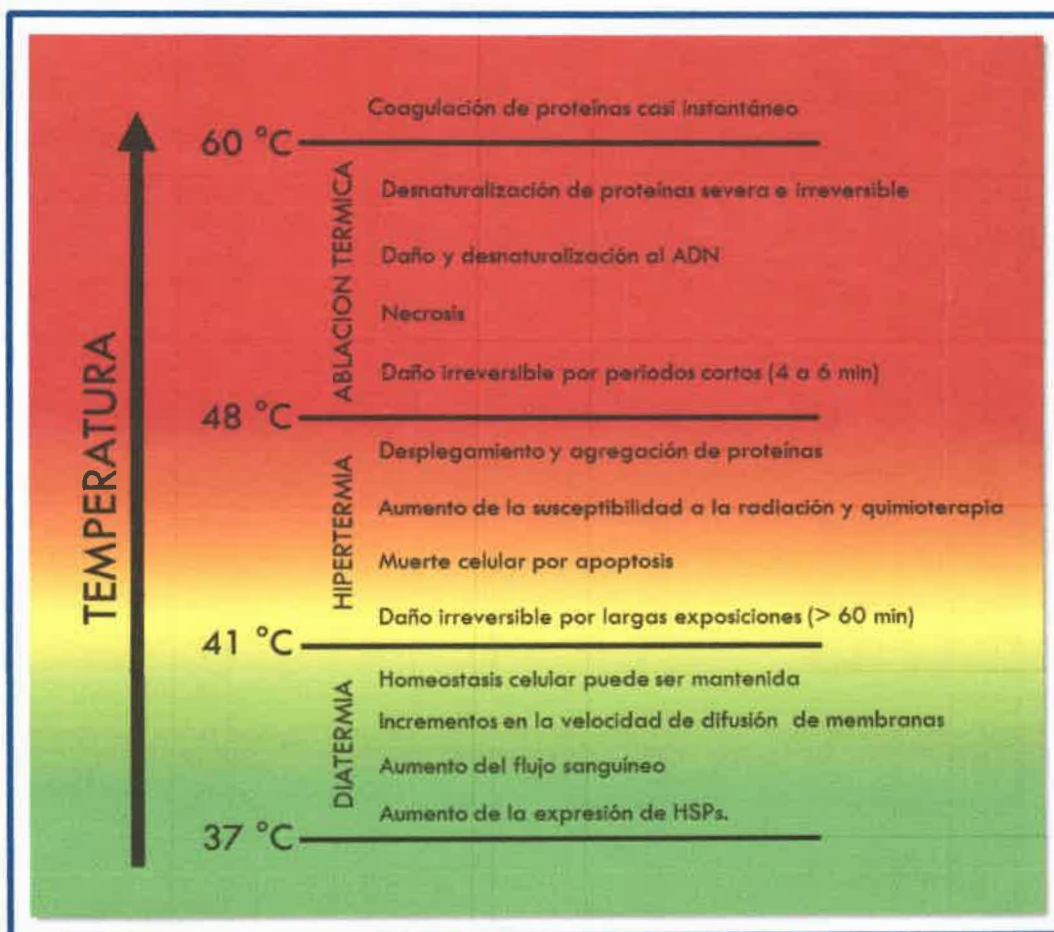


Figura 7: Efectos biológicos luego de la terapia fototérmica. Esquema tomado y adaptado de la referencia 103.

Generalmente, las células mueren a través de dos vías distintas: la apoptosis y la necrosis. La muerte celular necrótica se produce sin gasto de energía e implica la lisis con la liberación de su contenido celular al medio ambiente circundante<sup>101</sup>. La necrosis es una muerte celular traumática y ocurre cuando el daño a la célula es agudo y le sigue siempre una respuesta inflamatoria. La apoptosis, en contraste, es una muerte celular programada con gasto de energía y que implica la condensación de la cromatina nuclear, la contracción citoplasmática, la formación de ampollas en la membrana y la

externalización de la fosfatidilserina, la fragmentación nuclear y, finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos<sup>102</sup>.

La hipertermia es capaz de inducir tanto la necrosis como la apoptosis *in vitro* en función de la temperatura<sup>104,105</sup>. Por otra parte, la expresión de HSPs también está involucrada en la transición de la apoptosis a la necrosis. Este aumento de HSPs comienza con temperaturas por encima de 37 °C, y estas tienen como finalidad proteger proteínas intracelulares dañadas y ayudar a resistir la fragmentación del ADN<sup>93</sup>. Por lo tanto, protegen a las células de lesiones por estrés. Cuando se alcanza la temperatura crítica para la activación de la apoptosis (alrededor de 43 °C), la tensión térmica sostenida degenera este proceso de regulación a través de las HSPs y las células comienzan a morir por apoptosis. Si la temperatura sigue aumentando, se alcanza la temperatura crítica para la activación de necrosis (alrededor de 46 °C), las proteínas celulares se desnaturalizan y las células mueren de forma pasiva. Rangos de temperatura entre 41°C y 47°C han demostrado ser eficaces para matar células tumorales, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*<sup>83,95,106,107</sup>.

### 3.2. Métodos para generar hipertermia

Existen tres tipos de hipertermia que se emplean tradicionalmente en la práctica clínica para tratar el cáncer: la hipertermia de todo el cuerpo, la regional y la local. La hipertermia de todo el cuerpo se logra por métodos tales como mantas de agua caliente y cámaras térmicas, la cual por lo general se usa para el cáncer metastásico donde la hipertermia local sería ineficaz. La hipertermia regional depende de la perfusión de líquidos calientes que generalmente transportan agentes quimioterápicos para perfundir los tejidos cancerosos. Por último, la hipertermia local se aplica por lo general al tumor localizado, mientras que el tejido normal circundante no se calienta; esta puede ser aplicada por métodos externos o intersticiales o lumbinales (figura 8).

Uno de los principales obstáculos que impide que con la hipertermia se alcance el efecto terapéutico es la falta de métodos para focalizar de forma directa la producción de calor solamente en la región tumoral. Lesiones tumorales malignas superficiales podrían ser tratadas eficazmente con la hipertermia; sin embargo, otras modalidades de tratamiento, como la cirugía, son superiores en cuanto al resultado al tratamiento de estos tipos de lesiones. Por otro lado, los tumores más profundos o en regiones internas del cuerpo son difíciles de alcanzar por las fuentes de energía externas no invasivas que se



emplean en los métodos de calentamiento directo (microondas, radiofrecuencia, etc.); por lo tanto, con el objetivo de generar la hipertermia desde una fuente externa al tumor; inevitablemente se causa daño al tejido sano antes de que la temperatura en la región del tumor pueda ser terapéutica.

Las modalidades disponibles en la actualidad para generar hipertermia son a menudo limitadas por su incapacidad para atacar selectivamente al tejido tumoral y por lo tanto conllevan el riesgo de daño colateral a otros órganos y/o tejidos. La Terapia Térmica basada en la Nanotecnología, es una forma especial de hipertermia intersticial que puede selectivamente desencadenar calor al tumor. Esto se logra mediante el depósito de agentes de absorción de energía (nanomateriales) dentro de los tejidos tumorales que facilitan el calentamiento localizado. La llegada y concentración de nanopartículas en el tejido tumoral se puede lograr mediante dos formas. Una forma pasiva denominada Efecto de Aumento de la Permeabilidad y Retención (EPR, del inglés Enhanced Permeability and Retention Effect); el cual se manifiesta debido a la vasculatura defectuosa y por lo tanto permeable del tumor que permite que ciertos tamaños de moléculas (típicamente liposomas, nanopartículas, y fármacos macromoleculares), tiendan a acumularse en el tejido tumoral de manera selectiva en comparación a los tejidos normales<sup>108-110</sup>. Por otra parte, la forma activa de direccionamiento a tumores a través del marcado con ligandos y/o anticuerpos específicos, lo cual favorece que estos interactúen selectivamente con los receptores de membrana de las células tumorales. Hasta la actualidad, diversos nanomateriales se han probado para lograr este aumento de selectividad a células tumorales<sup>110-113</sup>.

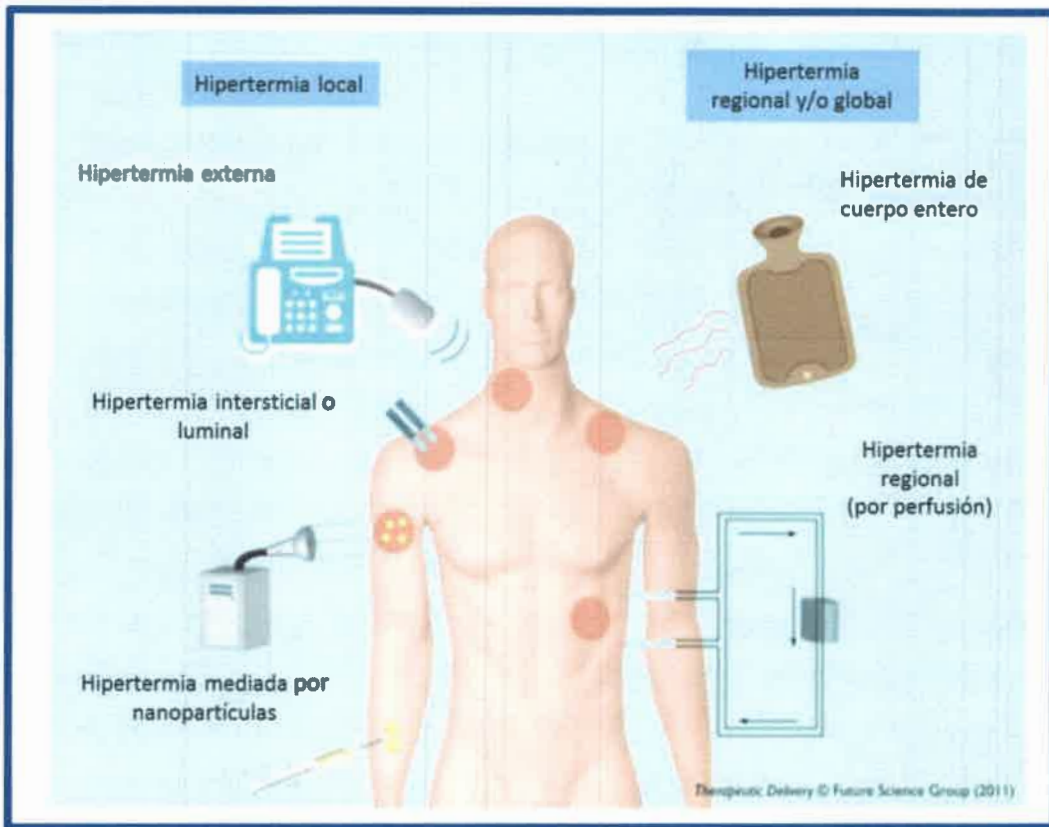


Figura 8: Métodos de generación de hipertermia para el tratamiento de enfermedades cancerosas. Figura tomada y adaptada de la referencia 114.

### 3.3. Nanomateriales en terapia fototérmica

Los recientes avances en materiales nanoparticulados han contribuido al diseño de métodos no invasivos para el calentamiento terapéutico de las células tumorales. Dentro de este tipo de hipertermia local, los nanomateriales con capacidad de generar calor, producto de la absorción de fotones, se han empleado con bastante éxito en la remoción de células tumorales.

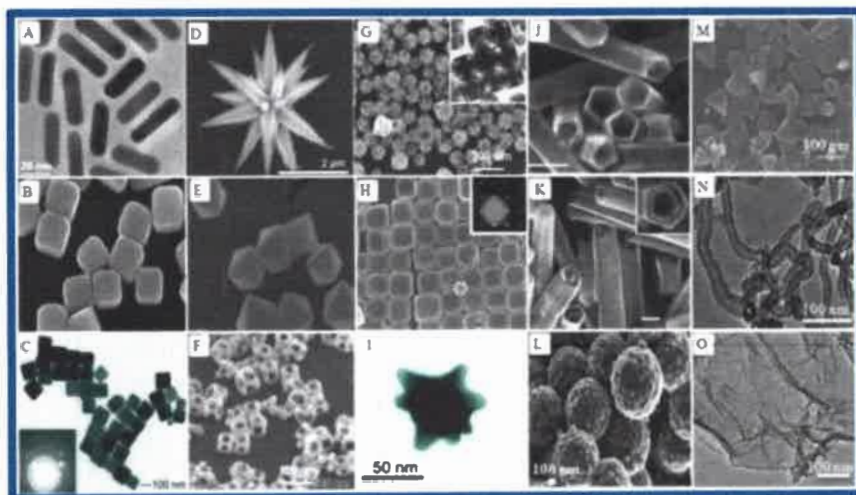
La TFT hace uso de nanomateriales que absorben luz en la región del infrarrojo cercano (NIR) con un rango de longitud de onda de 700-1100 nm. Esta luz puede penetrar fácilmente varios centímetros de tejido, debido a que la transmisión óptica en los tejidos y en la sangre es óptima y la absorción del agua es mínima. A partir de una fibra óptica con una longitud de onda adecuada, se logra una máxima penetración de la luz de forma homogénea en el área tumoral, y en la cual los tejidos sin tratar son virtualmente transparentes<sup>115</sup>. La fuente de irradiación utilizada es láser, el cual representa una fuente monocromática (una sola longitud de onda), posee una gran direccionalidad (escasa



divergencia) y puede concentrar un elevado número de fotones en áreas muy pequeñas. Los láseres más comúnmente usados son los de Neodymium Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd-YAG  $\lambda=1064$  nm) y el de diodos (700–980 nm)<sup>116,117</sup>. Cuando la absorción de la luz que proviene del láser es capturada por dichos nanomateriales, estos transforman esta energía radiante en energía vibracional generando el calor suficiente para matar las células tumorales.

A diferencia de la Terapia Fotodinámica, la TFT no requiere oxígeno para interactuar con las células o tejidos y utiliza longitudes de onda que son menos energética y por tanto menos dañina para las células y tejidos saludables<sup>118,119</sup>.

Diferentes nanomateriales fototérmicos se han empleado para el tratamiento de tumores a través de la TFT<sup>120</sup> (figura 9). Dos subgrupos principales de agentes fototérmicos son los más estudiados en la actualidad; aquellos basados en nanoestructuras de oro (nanocápsulas, nano-cajas, y nanorods) capaces de inducir la resonancia de plasmones superficiales (SPR)<sup>79,121</sup> y los nanotubos de carbono que permiten la ablación fototérmica de las células cancerosas a través de su activación con radiación en el rango del infrarrojo cercano (NIR)<sup>122,123</sup>.



*Figura 9: Diferentes nanomateriales a base de carbono, oro y metales oxidados con aplicaciones en Terapia Fototérmica como a) Au nanovarillas, b) y c) Ag nanocubos, d) Au mesoflores, e) Au nanooctaedros, f) Au nanotramas, g) y h) Au y Ag nanocajas, i) Au nanoestrellas, j) y k) Au y Ag nanotubos, l) Ag-Silica core-shell nanopartículas, m) Ag nanotriángulos, n) nanotubos de carbono y o) óxido de grafeno. Figura tomada de la referencia 120.*

### **3.3.1. Nanopartículas de oro**

Como se ha mencionado, las nanoestructuras de oro capaces de absorber luz de la región NIR (700-1200 nm) han despertado gran interés por su potencial terapéutico. La

SPR típica para nanoesferas de oro se localiza aproximadamente a una longitud de onda de 520 nm, pero puede ser desplazada a la región NIR modificando parámetros de la estructura de las mismas. El tamaño, forma, estructura y composición son factores que modifican la frecuencia de resonancia del plasmon superficial<sup>79,124,125</sup>. El control de la morfología y composición de las nanoestructuras de oro es un recurso poderoso para controlar su respuesta óptica, ya que pequeños cambios en la relación de aspecto de las partículas tienen un gran impacto sobre este parámetro<sup>126</sup>. En general, se utilizan dos estrategias para modificar la SPR en la región NIR mediante el control de la morfología de nanopartículas de oro macizas<sup>127</sup> y mediante el ajuste del espesor de las paredes en nanoestructuras de oro huecas o de tipo núcleo-caparazón, también denominados nanoshells (NS)<sup>97,119</sup>. La idea de la aplicación de las nanopartículas de oro en fotoablación térmica de tumores data de los años 50<sup>128</sup>, no habiendo sido ensayadas *in vivo* hasta los años 90<sup>129</sup>. Trabajos recientes empleando estos nanomateriales describen resultados prometedores con reducciones en el tamaño tumoral superiores al 90% en diversos modelos animales<sup>130-132</sup>.

### 3.3.2. Nanotubos de carbono

El mecanismo por el cual estos nanomateriales producen calor implica la excitación de las transiciones ópticas con la consiguiente relajación que resulta en modos de vibración mejoradas en la red de carbono del nanotubo que causan el calentamiento de la solución en que se encuentren. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* se han llevado a cabo para poner a prueba el efecto fototérmico en células tumorales. En la mayoría de los estudios *in vitro*, se ha empleado un sistema de iluminación láser que emite luz alrededor de 800 nm, con un flujo de potencia de 1 - 3 W/cm<sup>2</sup>. El tiempo de tratamiento varía de acuerdo a la potencia del láser y por lo general ronda cerca de los 3 minutos. Las concentraciones utilizadas de los nanotubos es de alrededor de 2,5 - 5 mg/L<sup>133-135</sup>. Recientemente, se ha informado la aplicación de nanotubos de carbono en ensayos *in vivo* empleando diferentes estrategias para optimizar la terapia como el recubrimiento con polietilenglicol para incrementar el tiempo de circulación en sangre<sup>136-138</sup>. Pero uno de los mayores inconvenientes con estos nanomateriales tiene que ver con la toxicidad de los mismos, por lo cual nuevos estudios se están llevando a cabo para mejorar la biocompatibilidad.

### **3.3.3. Nanopartículas a base de polímeros conjugados**

Al comparar nanopartículas a base de absorbentes orgánicos y no orgánicos, los no orgánicos, tales como nanopartículas de oro, por lo general tienen una capacidad de calentamiento superior que las nanopartículas a base de absorbentes orgánicos. Pero el mayor problema con estas nanopartículas no orgánicas es su biocompatibilidad. Este problema no existiría con nanopartículas a base de absorbentes orgánicos biodegradables. Otra ventaja con los colorantes orgánicos es que pueden ser más fácilmente encapsulados, o incorporados en vehículos en nano-escala, tales como polímeros o liposomas y por lo tanto se pueden combinar más fácilmente con drogas y/o marcadores celulares.

En la actualidad, se están empleando polímeros conjugados para sintetizar nanopartículas con propiedades interesantes que puedan ser usadas en terapias antitumorales<sup>118</sup>. Los polímeros conjugados son macromoléculas orgánicas formadas por una cadena central que contiene una serie de átomos unidos entre sí por una sucesión de enlaces simples y dobles (o triples) alternados a lo largo de la cadena. Esta estructura molecular le confiere al material características únicas tales como buena conductividad eléctrica (respecto a otros materiales orgánicos), excelente procesabilidad mecánica y la capacidad de emitir luz en la zona visible del espectro electromagnético tras excitación óptica o eléctrica.

Los polímeros conductores como polianilina (PANI) han sido desarrollados y estudiados para diversos fines, tales como materiales biomédicos, aplicaciones en ingeniería de tejidos y biosensores<sup>139-143</sup>. El gran interés despertado por estos materiales es debido a su propiedad electroquímica única<sup>144</sup>, las propiedades químicas y físicas<sup>145</sup>, la conductividad eléctrica, la estabilidad en el medio ambiente<sup>146</sup> y su biocompatibilidad<sup>147,148</sup>.

#### **3.3.3.1. Polianilina**

Un polímero conductor es un polímero de base orgánica que puede actuar como un semiconductor o un conductor. Los polímeros orgánicos más ampliamente estudiados son polianilina (PANI), polipirroles, politiofenos y polifenilvinilos<sup>149</sup>. Son polímeros conjugados debido a que tienen la deslocalización de electrones  $\pi$  lo largo de su cadena principal dándoles propiedades ópticas y eléctricas únicas. En estas moléculas, los electrones son capaces de moverse de un extremo del polímero a la otra a través del sistema p-orbital extendido<sup>150</sup>.

El polímero PANI fue descubierto inicialmente en 1834 por Runge, y se refirió a ésta como el negro de anilina<sup>151</sup>. Después de esto, Letheby llevó a cabo la investigación para analizar este material en 1862<sup>151</sup>. PANI se conoce como un polímero de estado de oxidación mixta, el cual está compuesto de unidades benzoides reducida y unidades quinoides oxidados<sup>152</sup>. Además, se descubrió que PANI presenta la característica de intercambio entre un estado conductor y uno aislante bajo ciertas condiciones experimentales como el pH.

El estado de oxidación promedio de PANI se expresa como  $1-y$ , donde el valor de  $y$  determina la existencia de cada uno de los tres estados de oxidación distintos de PANI<sup>152,153</sup>. Así PANI puede existir totalmente reducida en la forma leucoesmeraldina (LE), donde  $1-y = 0$ , en la forma medio oxidada de base esmeraldina (EB), donde  $1-y = 0,5$  y completamente oxidada de pernigranilina (PE), donde  $1-y = 1$ <sup>152</sup>. El estado EB se considera como la forma más útil debido a su alta estabilidad a temperatura ambiente (figura 10). En este estado, PANI está compuesto de dos unidades benzoides y una unidad quinoides que se alternan con propiedades de semiconductor. Una ventaja clave del polímero polianilina es que agentes de dopado como ácidos fuertes, ácidos de Lewis, metales de transición, iones alcalinos, generan por protonación una brecha interbanda entre los estados de valencia y conducción, que induce el movimiento de electrones y disminuye el nivel de excitación-energía<sup>154,155</sup>. Por lo tanto, durante el proceso de dopaje, el pico de absorbancia óptica de la polianilina se desplaza hacia el rojo, se mueve en menor energía, acercándose al NIR como resultado de su transición desde el estado de base esmeraldina (EB) al estado de sal esmeraldina (ES). La absorción de luz NIR por las nanopartículas de PANI resultarían de interés para ser desarrollado en TFT.



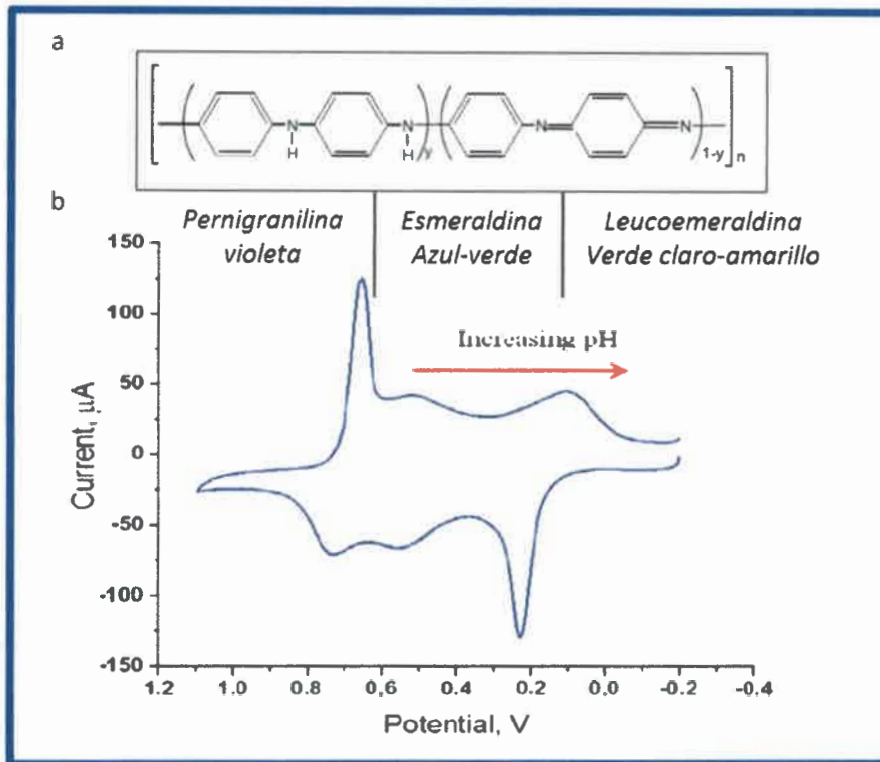


Figura 10: a) Diferentes estados de oxidación de la polianilina ( $y=1$ : leucoesmeraldina,  $y=0,5$ : emeraldina y  $y=0$ : pernigranilina, b) Voltamograma cíclico de un film de polianilina sobre un electrodo de platino en HCl (se muestran los potenciales a los que ocurren los cambios de estructura y de color de acuerdo al pH). Figura tomada y adaptada de la referencia 156.

La polianilina es sólo soluble en pocos solventes (N-metilpirrolidona, ácido sulfúrico o fórmico). Para superar este inconveniente y por lo tanto ampliar la utilidad del polímero en aplicaciones biológicas, es posible preparar una dispersión estable de nanopartículas de polímeros que se pueden recubrir y estabilizar con diferentes polímeros. La estabilización estérica con polímeros biocompatibles tales como PVP (polivinilpirrolidona), PNIPAM (poli-N-isopropilacrilamida) o HCP (hidroxipropilcelulosa) permite el uso de las dispersiones de nanopartículas en aplicaciones biológicas. Además, este tipo de estabilización es necesario para evitar la agregación y precipitación de las nanopartículas de polianilina.

#### 4. Nanotoxicología

Aunque se ha informado la biocompatibilidad de polímeros empleados en la síntesis de nanopartículas de polímeros conjugados, es de gran importancia la evaluación de la actividad tóxica y teratogénica de estos potenciales compuestos terapéuticos para



conocer sus alcances y limitaciones. Es de suma importancia demostrar que estas nanopartículas no causen efectos adversos en las concentraciones utilizadas. Varios trabajos mostraron que algunos nanomateriales pueden inducir toxicidad a través de la generación de estrés oxidativo<sup>157-159</sup>. Las respuestas biológicas varían desde respuestas antioxidantes para compensar el estrés oxidativo hasta la muerte celular vía apoptosis. Según estudios experimentales realizados, los objetos nanométricos presentan una toxicidad mayor debido a que éstos presentan entre otros, efectos inflamatorios mayores que los objetos de tamaño superior con la misma naturaleza química<sup>160,161</sup>. Estudios experimentales en animales demuestran que la respuesta biológica a ciertos nanomateriales aumentan con respecto a los mismos materiales en tamaños convencionales, debido al aumento del área superficial, además por su solubilidad, forma, carga, superficie química, propiedades catalíticas, contaminantes adsorbidos y grado de aglomeración<sup>162,163</sup>. La toxicidad también se ve afectada por la presencia de otros compuestos químicos adheridos sobre su superficie, como impurezas de síntesis, metales de transición, que dan lugar a la formación de compuestos reactivos de oxígeno que originan procesos de inflamación<sup>164-166</sup>.

En consecuencia, han surgido tres elementos clave de las estrategias de evaluación de la toxicidad de nanopartículas, los cuales han sido diseñados por Oberdörster y col.; la caracterización fisicoquímica (tamaño, superficie, forma, solubilidad, agregación) y el esclarecimiento de los efectos biológicos implicados en la interacción con nanopartículas tanto *in vitro* como en estudios *in vivo*<sup>167</sup>. Estos tres elementos fueron formulados principalmente desde el punto de vista de los efectos potenciales de las nanopartículas en los seres humanos. Aunque existen muchos trabajos acerca de la toxicidad de nanomateriales en bacterias, en líneas celulares de mamíferos y en mamíferos, la disciplina científica de nanotoxicología se encuentra todavía en vías de desarrollo<sup>168-170</sup>. Podríamos definir a la nanotoxicología como una rama de la nanotecnología que se encarga de evaluar los efectos de los nanomateriales en los seres vivos y en el medio ambiente a través de estudios toxicológicos y epidemiológicos. La evaluación de riesgos se basa en describir los elementos de la exposición y el peligro. Los principales componentes de una evaluación de riesgos son: identificación del peligro, evaluación de la dosis-respuesta, evaluación de la exposición y evaluación del riesgo, propiamente dicha, y gestión del riesgo<sup>171,172</sup>.

Las nanopartículas pueden tener un impacto también en el medio ambiente a través de un efecto directo sobre la biota<sup>173</sup>, cambios en la biodisponibilidad de nutrientes

o toxinas<sup>174</sup>; los efectos indirectos derivados de su interacción con los compuestos orgánicos naturales<sup>166</sup> y/o cambios en la microestructura del medio ambiente<sup>175</sup>. Además también pueden interactuar con compuestos orgánicos tóxicos y amplificar o disminuir su toxicidad. Las posibles interacciones entre los contaminantes orgánicos y nanopartículas pueden dar lugar a un sistema inerte para los organismos vivos, en un agente más tóxico o no tener efecto alguno. Así, las nanopartículas pueden adsorber un contaminante, reduciendo su concentración libre y disminuyendo su toxicidad como resultado de esta interacción. Sin embargo, si las nanopartículas que contienen un contaminante adsorbido son absorbidas por las células, puede resultar en un efecto tóxico del propio contaminante, de las nanopartículas o de la acción sinérgica de ambos<sup>170,176</sup>.

#### **4.1. Mecanismos de toxicidad de nanomateriales**

De acuerdo a muchos investigadores, el principal mecanismo molecular de toxicidad de nanomateriales, es la generación de estrés oxidativo por la formación de radicales libres debido a la interacción con los mismos<sup>177,178</sup>. En exceso, los radicales libres (ROS) causan daños a componentes biológicos a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Varios trabajos han indicado que algunos nanomateriales pueden inducir daño oxidativo, inflamación, fibrosis y citotoxicidad cuando se administran en organismos vivos. El estrés oxidativo puede tener un papel en la inducción de procesos de inflamación a través de la regulación positiva de factores de transcripción sensibles a redox por ejemplo NF- $\kappa$ B, la proteína activadora-1, y quinasas implicadas en la inflamación<sup>157,158,179,180</sup>. Estos ROS pueden provenir de varias fuentes, incluyendo la respuesta fagocítica de las células a material extraño (nanomateriales), una cantidad insuficiente de antioxidantes, la presencia de metales de transición en la síntesis de nanopartículas como también a factores ambientales, etc. A todas estas fuentes se sumarian las propiedades físico-químicas de algunos nanomateriales<sup>181</sup>. Se supone que la interacción con el área superficial de las nanopartículas sería la principal responsable de los efectos adversos. Esto se debe a que partículas, en escala manométrica, con un área superficial aumentada poseen más átomos y moléculas expuestas; y por lo tanto más grupos reactivos del material en la superficie que no estarían accesibles en partículas de mayor tamaño del mismo material.

Por otro lado, el tamaño desempeña un papel importante en cómo el organismo responde para distribuir y eliminar los nanomateriales<sup>182,183</sup>. Es de amplio conocimiento

como el tamaño de las nanopartículas, puede afectar el modo de incorporación celular, y la eficiencia de procesamiento de partículas en la vía endocítica<sup>184-186</sup>. Más importante aún, la disminución del tamaño de nanopartículas lleva a un aumento exponencial del área de superficie en relación con el volumen, con lo que la superficie de nanomateriales se vuelve más reactiva para su entorno circundante (componentes biológicos). De acuerdo a esto, el tamaño que presenten estos nanomateriales puede llevar a un aumento en la absorción y acumulación en ciertos tejidos en los que pueden interferir con las funciones biológicas esenciales<sup>177</sup>. En concordancia, se ha reportado que luego de la administración de nanopartículas por diversas vías en animales; el lento aclaramiento sanguíneo y la acumulación en tejidos del sistema retículo endotelial (RES) hacen de órganos tales como el hígado y el bazo los principales órganos diana de impacto de nanomateriales. Además, los órganos de alto flujo sanguíneo que están expuestos a los nanomateriales, como los riñones y los pulmones, también pueden verse afectados<sup>187,188</sup>.

#### **4.2. Modelos experimentales para análisis de la toxicidad de nanomateriales**

Teniendo en cuenta que no hay gran cantidad de datos bibliográficos sobre la toxicidad de nanomateriales en la salud humana y en el medio ambiente es que existe una necesidad urgente de información acerca del potencial toxicológico de estos compuestos. Aunque en la actualidad se han informado de varios modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* para el estudio de las interacciones de los nanomateriales en los sistemas biológicos<sup>189-193</sup>. Los estudios *in vitro*, que se basan en el cultivo de células, tienen el inconveniente de que proporcionan una evaluación incompleta de las interacciones con todo el organismo<sup>194,195</sup>. Los modelos de evaluación *in vivo* abordan el efecto global sobre la fisiología y la anatomía del organismo, y por lo tanto constituyen una plataforma más inmediatamente relevante para los estudios clínicos traslacionales<sup>196-198</sup>. A la vez, los modelos *in vivo* se han utilizado para evaluar el impacto ambiental de los nanomateriales, centrándose principalmente en los organismos acuáticos que representan a los principales niveles de la red alimentaria (bacterias, algas, crustáceos, peces y ciliados)<sup>199,200</sup>. Desafortunadamente, los modelos con animales mamíferos ampliamente usados (roedores) son costosos, muy laboriosos y generan cuestiones éticas.

Recientemente, ha habido un creciente interés en la comunidad científica en las interacciones entre los nano-materiales y organismos no mamíferos, los cuales están siendo reconocidos como modelos válidos para el estudio de las enfermedades



humanas<sup>201</sup>. Por ejemplo los anfibios están siendo cada vez más utilizados en la evaluación de toxicidad debido a su alta sensibilidad al estrés físico-químico. En particular, los embriones de anfibios son indicadores útiles de la contaminación ambiental y se han empleado para evaluar la embriotoxicidad de varios productos químicos<sup>202-204</sup> y diferentes muestras ambientales<sup>205</sup>.

Los anfibios son especialmente sensibles a numerosos contaminantes ambientales y xenobióticos durante las etapas embrionarias, debido a su posición en la cadena alimentaria, la permeabilidad de la piel a sustancias tóxicas, y la vulnerabilidad que provoca la metamorfosis durante el desarrollo de las larvas<sup>206</sup>. El desarrollo embrionario y las primeras etapas de vida, proporciona información que puede ser útil en la estimación de la toxicidad crónica de un material de ensayo para los organismos acuáticos. Gracias a sus tres criterios de valoración (mortalidad embrionaria, malformación, y la inhibición del crecimiento), la prueba en anfibios pueden detectar xenobióticos que afecten el desarrollo embrionario, un eslabón débil en el círculo de la vida de un organismo<sup>207</sup>. El término "efectos embriotóxicos" es usado para describir todo fracaso en el desarrollo embrional que ha sido causado por químicos del ambiente donde se desarrolla la larva. Las fallas que causan la muerte de los embriones o larvas son descriptas como "embrioletales", mientras que aquellas que resultan en malformaciones o que retardan el proceso de desarrollo son llamados "efectos teratogénicos".

En nuestro laboratorio se ha determinado la biocompatibilidad de polímeros nanoestructurados a través de ensayos de toxicidad en larvas de anfibios en estadios metamórficos<sup>208</sup>. Este modelo experimental posee propiedades interesantes tales como la relativa facilidad de la cría y el desarrollo de las larvas en las condiciones de laboratorio, la alta sensibilidad de los mismos al producir una respuesta a un tratamiento, además del bajo costo económico<sup>204</sup>.

**Bibliografía**

1. Zhang, L. *et al.* Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–9 (2008).
2. Courvreur P, Grislain L, Lenaerts V, Brasseur F, Guiot P, B. A. in *Polym. Nanoparticles Microspheres* (Guiot P, C. P.) 27–93 (1986).
3. Florence, A. T. & Hussain, N. Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50 Suppl 1**, S69–89 (2001).
4. Jain, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta.* **358**, 37–54 (2005).
5. Pathak P and Katiyar V K. Multi-Functional Nanoparticles and Their Role in Cancer Drug Delivery – A Review. *AZojono - J. Nanotechnol. Online* 1–17 (2007). doi:10.2240/azojono0114
6. Freitas, R. A. The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Stud. Health Technol. Inform.* **80**, 45–59 (2002).
7. Bogunia-Kubik, K. & Sugisaka, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems* **65**, 123–138 (2002).
8. Larena Pellejero A. Aplicaciones de nuevos nanomateriales en cirugía ortopédica y traumatología. *Patol. del Apar. Locomot.* **5**, 116–124 (2007).
9. Anker, J. N. *et al.* Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* **7**, 442–53 (2008).
10. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release* **155**, 344–57 (2011).
11. Wu, C. & Chiu, D. T. Highly fluorescent semiconducting polymer dots for biology and medicine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 3086–109 (2013).
12. Danhier, F. *et al.* Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *J. Control. Release* **140**, 166–73 (2009).
13. Haley, B. & Frenkel, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.* **26**, 57–64 (2008).
14. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
15. Horch, R. A. *et al.* Nanoreinforcement of poly(propylene fumarate)-based networks with surface modified alumoxane nanoparticles for bone tissue engineering. *Biomacromolecules* **5**, 1990–8 (2004).
16. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161–71 (2005).



17. Mahmood, M., Casciano, D., Xu, Y. & Biris, A. S. Engineered nanostructural materials for application in cancer biology and medicine. *J. Appl. Toxicol.* **32**, 10–9 (2012).
18. Hall, P. A. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 3rd edn. L. M. Franks and N. M. Teich. Oxford University Press, Oxford, 1997. No. of pages: 468. Price: £55.00 (Hardback). ISBN: 0 19 854854 0. *J. Pathol.* **186**, 222–222 (1998).
19. Kushlinskiĭ, N. E. & Nemtsova, M. V. [Molecular biological characteristics of cancer]. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* 5–15 (2014). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25055553>>
20. Institute, N. C. What Is Cancer? *Underst. Cancer Ser. Cancer* (2014). at <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>
21. Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497–503 (2000).
22. Vella, F. Molecular biology of the cell (third edition). *Biochem. Educ.* **22**, 164 (1994).
23. Martinez, J. D., Parker, M. T., Fultz, K. E., Ignatenko, N. A. and Gerner, E. W. in *Burger's Med. Chem. Drug Discov.* 5:1–50 (2003).
24. Sheer D. in *Introd. to Cell. Mol. Biol. Cancer* 225–45 (2nd ed Oxford, Oxford University Press, 1997). at <[http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig\\_q=RN:19104728](http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:19104728)>
25. Weinberg, R. Así se produce el Cáncer. *Investig. Cienc.* **11**, 10–18 (1996).
26. Fotakis, G. & Timbrell, J. a. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**, 171–7 (2006).
27. Bernal Balález, A. E. Evaluación de la actividad mitótica de la carcinogénesis oral con el empleo de un analizador de imágenes Leitz ASM-68K. *Rev. Fed. Odontol. Colomb* **53**, 57–61
28. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
29. Chen, J. *et al.* Deficiency of FLCN in mouse kidney led to development of polycystic kidneys and renal neoplasia. *PLoS One* **3**, e3581 (2008).
30. Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. & Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**, 332–7 (2004).
31. Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R. V, Haupt, S. & Haupt, Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J. Pathol.* **219**, 3–15 (2009).
32. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–37 (2007).
33. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–15 (2004).



34. Evan, G. & Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317–22 (1998).
35. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 72–6 (2000).
36. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–22 (2005).
37. Ferrara, N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 21–6 (2010).
38. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 789–91 (2009).
39. Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 329–37 (2009).
40. Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649–69 (2010).
41. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–8 (2003).
42. Salk, J. J., Fox, E. J. & Loeb, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 51–75 (2010).
43. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–8 (2010).
44. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309–16 (2010).
45. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
46. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–99 (2010).
47. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–48 (2009).
48. Semenza, G. L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* **118**, 3835–7 (2008).
49. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 51–6 (2010).
50. Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* **31**, 220–7 (2010).

51. Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M. & Swartz, M. A. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* **328**, 749–52 (2010).
52. Zindl, C. L. & Chaplin, D. D. Immunology. Tumor immune evasion. *Science* **328**, 697–8 (2010).
53. Williams, G. T. & Smith, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* **74**, 777–9 (1993).
54. Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440–2 (1988).
55. Pelengaris, S. & Khan, M. Oncogenic co-operation in beta-cell tumorigenesis. *Endocr. Relat. Cancer* **8**, 307–14 (2001).
56. International Agency of Research on Cancer. GLOBOCAN 2012 Estimate Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. (2012). at <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#> >
57. Priester, W. A. Skin Tumors in Domestic Animals. Data from 12 United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. *J Natl Cancer Inst* **50**, 457–466 (1973).
58. Bostock, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br. Vet. J.* **142**, 1–19
59. Moriello, K. A. & Rosenthal, R. C. Clinical approach to tumors of the skin and subcutaneous tissues. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **20**, 1163–90 (1990).
60. Kufe, D. W. *et al.* Holland-Frei Cancer Medicine. (2003). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>>
61. Arvelo, F., Merentes, E. & Cotte, C. Resistencia multidroga (MDR) o pleiotrópica. *Acta científica Venez.* **51**, 45–52 (2000).
62. Blanchard EM, H. P. in *DeVita, Hellman, Rosenberg's Cancer Princ. Pract. Oncol.* 2321–2328 (Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers, 2011).
63. Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects. *Cancer Treat. Rep.* **68**, 233–55 (1984).
64. Palucka, K., Ueno, H., Fay, J. & Banchereau, J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J. Intern. Med.* **269**, 64–73 (2011).
65. Escrig de Casas E, A. P. S. *TERAPIA GENICA DEL CANCER. Farm. Clínica* **14**, 259–269 (1997).
66. Curiel, D. T., Gerritsen, W. R. & Krul, M. R. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1197–9 (2000).
67. Untch, M. & Thomssen, C. Clinical practice decisions in endocrine therapy. *Cancer Invest.* **28 Suppl 1**, 4–13 (2010).

68. Lawrence TS, Ten Haken RK, G. A. in *DeVita VT, Lawrence TS, Rosenb. SA, Ed. Cancer Princ. Pract. Oncol. 8th ed.* (Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins., 2008).
69. Milla Sanabria, L. *et al.* Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* **1835**, 36–45 (2013).
70. Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P. & Reynolds, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **8**, 14–29 (2011).
71. Robertson, C. a, Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B.* **96**, 1–8 (2009).
72. Ramírez Backhaus, M., Trassierra Villa, M., Vera Donoso, C. D. & Jiménez Cruz, J. F. Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado. *Actas Urológicas Españolas* **31**, 633–641 (2007).
73. Dougherty, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889–905 (1998).
74. Chatterjee, D. K., Fong, L. S. & Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1627–37 (2008).
75. Olivo, M., Bhuvaneswari, R., Lucky, S. S., Dendukuri, N. & Soo-Ping Thong, P. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-Tumor Modalities. *Pharmaceuticals* **3**, 1507–1529 (2010).
76. Wang, C., Cheng, L. & Liu, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. *Biomaterials* **32**, 1110–20 (2011).
77. Zhang, P., Steelant, W., Kumar, M. & Scholfield, M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4526–7 (2007).
78. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol.* **82**, 412–7 (2006).
79. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **23**, 217–28 (2008).
80. Griffin, R. J., Dings, R. P. M., Jamshidi-Parsian, A. & Song, C. W. Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int. J. Hyperthermia* **26**, 256–63 (2010).
81. Tang, Y. Cancer Therapy Combining Modalities of Hyperthermia and Chemotherapy : in vitro Cellular Response after Rapid Heat Accumulation in the Cancer Cell. (2010).
82. Fajardo, L. F., Egbert, B., Marmor, J. & Hahn, G. M. Effects of hyperthermia in a malignant tumor. *Cancer* **45**, 613–23 (1980).



83. Burd, R. *et al.* Tumor cell apoptosis, lymphocyte recruitment and tumor vascular changes are induced by low temperature, long duration (fever-like) whole body hyperthermia. *J. Cell. Physiol.* **177**, 137–47 (1998).
84. Dewhirst, M. W., Vujaskovic, Z., Jones, E. & Thrall, D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 779–90 (2005).
85. Mendecki, J., Friedenthal, E., Botstein, C., Paglione, R. & Sterzer, F. Microwave applicators for localized hyperthermia treatment of cancer of the prostate. *Int. J. Radiat. Oncol.* **6**, 1583–1588 (1980).
86. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 487–497 (2002).
87. Johannsen, M. *et al.* Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 637–47 (2005).
88. Yarmolenko, P. S. *et al.* Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. *Int. J. Hyperthermia* **27**, 320–43 (2011).
89. Dewhirst, M. W., Viglianti, B. L., Lora-Michiels, M., Hanson, M. & Hoopes, P. J. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **19**, 267–94 (2003).
90. Van der Zee, J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* **13**, 1173–1184 (2002).
91. Storm, F. K., Harrison, W. H., Elliott, R. S. & Morton, D. L. Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.* **39**, 2245–51 (1979).
92. O’Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D. & West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* **209**, 171–6 (2004).
93. Kampinga, H. H. Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field. *Int. J. Hyperthermia* **22**, 191–6 (2006).
94. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33–56 (2002).
95. Chatterjee, D., Diagaradjane, P. & Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2**, 1001–1014 (2011).
96. Singh, R. & Torti, S. V. Carbon nanotubes in hyperthermia therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 2045–60 (2013).
97. Vankayala, R., Lin, C.-C., Kalluru, P., Chiang, C.-S. & Hwang, K. C. Gold nanoshells-mediated bimodal photodynamic and photothermal cancer treatment using ultra-low doses of near infra-red light. *Biomaterials* **35**, 5527–38 (2014).

98. Cherukuri, P., Glazer, E. S. & Curley, S. a. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 339–45 (2010).
99. Madsen, S. J., Baek, S.-K., Makkouk, A. R., Krasieva, T. & Hirschberg, H. Macrophages as cell-based delivery systems for nanoshells in photothermal therapy. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 507–15 (2012).
100. Yuan, H. *et al.* In vivo particle tracking and photothermal ablation using plasmon-resonant gold nanostars. *Nanomedicine* 1–9 (2012). doi:10.1016/j.nano.2012.02.005
101. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).
102. Webb, S. J., Harrison, D. J. & Wyllie, A. H. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv. Pharmacol.* **41**, 1–34 (1997).
103. Jaque, D. *et al.* Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* 1–35 (2014). doi:10.1039/C4NR00708E
104. Harmon, B. V *et al.* Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 845–58 (1990).
105. Yoo, D. *et al.* Double-effector nanoparticles: a synergistic approach to apoptotic hyperthermia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 12482–5 (2012).
106. Urano, M., Kuroda, M. & Nishimura, Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int. J. Hyperthermia* **15**, 79–107 (1999).
107. Dewhirst, M. W. *et al.* Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future. *Semin. Oncol.* **24**, 616–25 (1997).
108. Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y. & Kaneo, Y. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int. J. Pharm.* **277**, 39–61 (2004).
109. Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **11**, 812–8 (2006).
110. Stylianopoulos, T., Wong, C., Bawendi, M. G., Jain, R. K. & Fukumura, D. *Multistage nanoparticles for improved delivery into tumor tissue. Methods Enzymol.* **508**, 109–30 (Elsevier Inc., 2012).
111. Goutayer, M. *et al.* Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 137–47 (2010).
112. Huang, Y. *et al.* Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 7106–16 (2013).
113. Huang, S. *et al.* Tumor-Targeting and Smart Nanoparticles for Combination Therapy of. 2860–2871 (2013).

114. Krishnan, S. P. D. C. S. Nanoparticle-mediated thermal therapy: Evolving strategies for prostate cancer therapy. *Int J Hyperth.* **26**, 775–789 (2011).
115. Nikfarjam, M., Muralidharan, V. & Christophi, C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J. Surg. Res.* **127**, 208–23 (2005).
116. Usatoff, V. & Habib, N. A. Update of laser-induced thermotherapy for liver tumors. *Hepatogastroenterology.* **48**, 330–2 (2001).
117. Muralidharan, V. & Christophi, C. Interstitial laser thermotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *J. Surg. Oncol.* **76**, 73–81 (2001).
118. Xu, L., Cheng, L., Wang, C., Peng, R. & Liu, Z. Conjugated polymers for photothermal therapy of cancer. *Polym. Chem.* (2014). doi:10.1039/b000000x
119. Schwartz, J. a *et al.* Feasibility study of particle-assisted laser ablation of brain tumors in orthotopic canine model. *Cancer Res.* **69**, 1659–67 (2009).
120. Shibu, E. S., Hamada, M., Murase, N. & Biju, V. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **15**, 53–72 (2013).
121. Huff, T. B. *et al.* Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine (Lond).* **2**, 125–132 (2007).
122. Liu, X. *et al.* Optimization of surface chemistry on single-walled carbon nanotubes for in vivo photothermal ablation of tumors. *Biomaterials* **32**, 144–51 (2011).
123. Burke, A. R. *et al.* The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials* **33**, 2961–70 (2012).
124. Iancu, C. Photothermal Therapy of Human Cancers (PTT) Using Gold Nanoparticles. *Biotechnol. Mol. Biol. Nanomedicine* **1**, (2013).
125. Choi, J. *et al.* Gold nanostructures as photothermal therapy agent for cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **11**, 953–64 (2011).
126. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
127. Yang, D.-P. & Cui, D.-X. Advances and prospects of gold nanorods. *Chem. Asian J.* **3**, 2010–22 (2008).
128. Aden, A. L. & Kerker, M. Scattering of Electromagnetic Waves from Two Concentric Spheres. *J. Appl. Phys.* **22**, 1242 (1951).
129. Welch Ashley, V. G. M. J. C. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue.* (Springer Netherlands, 2011). doi:10.1007/978-90-481-8831-4
130. Han, J. *et al.* Photothermal therapy of cancer cells using novel hollow gold nanoflowers. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 517–26 (2014).

131. Schwartz, J. a. *et al.* Nanoparticle-assisted photothermal ablation of brain tumor in an orthotopic canine model. *Proc. SPIE* **7161**, 716111–716130 (2009).
132. Larson, N., Gormley, A., Frazier, N. & Ghandehari, H. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of heat shock protein targeted HPMA copolymer-drug conjugates and gold nanorod induced hyperthermia. *J. Control. Release* **170**, 41–50 (2013).
133. Liu, X. *et al.* Optimization of surface chemistry on single-walled carbon nanotubes for in vivo photothermal ablation of tumors. *Biomaterials* **32**, 144–51 (2011).
134. Shao, N., Lu, S., Wickstrom, E. & Panchapakesan, B. Integrated molecular targeting of IGF1R and HER2 surface receptors and destruction of breast cancer cells using single wall carbon nanotubes. *Nanotechnology* **18**, 315101 (2007).
135. Markovic, Z. M. *et al.* In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* **32**, 1121–9 (2011).
136. Huang, N. *et al.* Single-wall carbon nanotubes assisted photothermal cancer therapy: animal study with a murine model of squamous cell carcinoma. *Lasers Surg. Med.* **42**, 638–48 (2010).
137. Burke, A. *et al.* Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12897–902 (2009).
138. Moon, H. K., Lee, S. H. & Choi, H. C. In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes. *ACS Nano* **3**, 3707–13 (2009).
139. Ameen, S., Ali, V., Zulfeqar, M., Mazharul Haq, M. & Husain, M. Synthesis and characterization of polyaniline-polyvinyl chloride blends doped with sulfamic acid in aqueous tetrahydrofuran. *Cent. Eur. J. Chem.* **4**, 565–577 (2006).
140. Kucekova, Z. *et al.* Colloidal polyaniline dispersions: antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **116**, 411–7 (2014).
141. Liu, J., Tian, S. & Knoll, W. Properties of polyaniline/carbon nanotube multilayer films in neutral solution and their application for stable low-potential detection of reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide. *Langmuir* **21**, 5596–9 (2005).
142. Virji, S., Huang, J., Kaner, R. B. & Weiller, B. H. Polyaniline Nanofiber Gas Sensors: Examination of Response Mechanisms. *Nano Lett.* **4**, 491–496 (2004).
143. Stejskal, J. *et al.* Purification of a conducting polymer, polyaniline, for biomedical applications. *Synth. Met.* **195**, 286–293 (2014).
144. Chang, H., Yuan, Y., Shi, N. & Guan, Y. Electrochemical DNA biosensor based on conducting polyaniline nanotube array. *Anal. Chem.* **79**, 5111–5 (2007).
145. Langer, J. J. *et al.* Polyaniline biosensor for choline determination. *Surf. Sci.* **573**, 140–145 (2004).



146. Ben-Valid, S. *et al.* Polyaniline-coated single-walled carbon nanotubes: synthesis, characterization and impact on primary immune cells. *J. Mater. Chem.* **20**, 2408 (2010).
147. Humpolicek, P., Kasparkova, V., Saha, P. & Stejskal, J. Biocompatibility of polyaniline. *Synth. Met.* **162**, 722–727 (2012).
148. Prabhakar, P. K., Raj, S., Anuradha, P. R., Sawant, S. N. & Doble, M. Biocompatibility studies on polyaniline and polyaniline-silver nanoparticle coated polyurethane composite. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **86**, 146–53 (2011).
149. Jotiram, K. P., Prasad, R. G. S. V., Jakka, V. S., Aparna, R. S. L. & Phani, A. R. Antibacterial Activity of Nanostructured Polyaniline Combined With Mupirocin. *Nano Biomed. Eng.* **4**, 144–149 (2012).
150. Md. Aminur Rahman, P. K. D.-S. P. Y.-B. S. Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers. *Sensors (Basel)*. **8**, 118 (2008).
151. Letheby, H. XXIX. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. *J. Chem. Soc.* **15**, 161 (1862).
152. Shimano, J. Y. & MacDiarmid, A. G. Polyaniline, a dynamic block copolymer: key to attaining its intrinsic conductivity? *Synth. Met.* **123**, 251–262 (2001).
153. Green, A. G. & Woodhead, A. E. CCXLIII. Aniline-black and allied compounds. Part I. *J. Chem. Soc. Trans.* **97**, 2388 (1910).
154. Sapurina, I. Y. & Stejskal, J. The effect of pH on the oxidative polymerization of aniline and the morphology and properties of products. *Russ. Chem. Rev.* **79**, 1123–1143 (2011).
155. Stejskal, J. & Sapurina, I. On the origin of colloidal particles in the dispersion polymerization of aniline. *J. Colloid Interface Sci.* **274**, 489–95 (2004).
156. Molapo, K. M. *et al.* Electronics of conjugated polymers (I): Polyaniline. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**, 11859–11875 (2012).
157. Park, E.-J. & Park, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* **184**, 18–25 (2009).
158. Manke, A., Wang, L. & Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res. Int.* **2013**, 942916 (2013).
159. Passagne, I., Morille, M., Rousset, M., Pujalté, I. & L'azou, B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology* **299**, 112–24 (2012).
160. Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. & Möller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1726–32 (2008).
161. Park, E.-J. *et al.* Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 162–8 (2010).

162. Usenko, C. Y., Harper, S. L. & Tanguay, R. L. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 44–55 (2008).
163. Lyon, D. Y., Adams, L. K., Falkner, J. C. & Alvarez, P. J. J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4360–6 (2006).
164. Chen, Z. *et al.* Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett.* **163**, 109–20 (2006).
165. Henry, T. B. *et al.* Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environ. Health Perspect.* **115**, 1059–65 (2007).
166. Baun, a, Sørensen, S. N., Rasmussen, R. F., Hartmann, N. B. & Koch, C. B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquat. Toxicol.* **86**, 379–87 (2008).
167. Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* **113**, 823–839 (2005).
168. Moore, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* **32**, 967–76 (2006).
169. Oberdörster, G., Stone, V. & Donaldson, K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* **1**, 2–25 (2007).
170. Nowack, B. & Bucheli, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* **150**, 5–22 (2007).
171. Foss Hansen, S., Larsen, B. H., Olsen, S. I. & Baun, A. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* **1**, 243–250 (2007).
172. Hoet, P. H. M., Nemmar, A. & Nemery, B. Health impact of nanomaterials? *Nat. Biotechnol.* **22**, 19 (2004).
173. Bondarenko, O. *et al.* Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol.* **87**, 1181–200 (2013).
174. Wiesner, M. R., Lowry, G. V, Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4336–45 (2006).
175. Zhu, Y., Zhao, Q., Li, Y., Cai, X. & Li, W. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylynychia mytilus*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 1357–64 (2006).
176. Ortega, R. *et al.* Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity: the case of cobalt oxide on human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* **11**, 14 (2014).

177. Lanone, S. & Boczkowski, J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.* **6**, 651–63 (2006).
178. Salvaterra, T. *et al.* Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). *Aquat. Toxicol.* **128-129**, 190–2 (2013).
179. Chang, C. The immune effects of naturally occurring and synthetic nanoparticles. *J. Autoimmun.* **34**, J234–46 (2010).
180. Higashisaka, K. *et al.* Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials* **32**, 3–9 (2011).
181. Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J. & Forrest, M. L. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 457–66 (2009).
182. Balogh, L. *et al.* Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. *Nanomedicine* **3**, 281–96 (2007).
183. Hirn, S. *et al.* Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 407–16 (2011).
184. Fernando, L. P. *et al.* Mechanism of cellular uptake of highly fluorescent conjugated polymer nanoparticles. *Biomacromolecules* **11**, 2675–82 (2010).
185. Chithrani, B. D. & Chan, W. C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **7**, 1542–50 (2007).
186. Thurn, K. T. *et al.* Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine* **7**, 123–30 (2011).
187. Liu, T. *et al.* Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* **32**, 1657–68 (2011).
188. Wu, H. *et al.* The behavior after intravenous injection in mice of multiwalled carbon nanotube / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hybrid MRI contrast agents. *Biomaterials* **32**, 4867–76 (2011).
189. Cheng, J. *et al.* Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235**, 216–25 (2009).
190. Fako, V. E. & Furgeson, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 478–86 (2009).
191. Chang, Y. *et al.* In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* **200**, 201–10 (2011).
192. Lasagna-Reeves, C. *et al.* Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 649–55 (2010).

193. Manabe, M., Tatarazako, N. & Kinoshita, M. Uptake, excretion and toxicity of nano-sized latex particles on medaka (*Oryzias latipes*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* **105**, 576–81 (2011).
194. Rashidi, L. *et al.* A cellular uptake and cytotoxicity properties study of gallic acid-loaded mesoporous silica nanoparticles on Caco-2 cells. *J. Nanoparticle Res.* **16**, 2285 (2014).
195. Laha, D. *et al.* Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1–9 (2014).
196. Roy, R., Kumar, S., Tripathi, A., Das, M. & Dwivedi, P. D. Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunol. Lett.* **158**, 79–87 (2014).
197. Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R. M. & Hennink, W. E. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **35**, 3365–83 (2014).
198. El-Dakdouki, M. H. *et al.* Assessing the in vivo efficacy of doxorubicin loaded hyaluronan nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 697–705 (2014).
199. Lapresta-Fernández, A., Fernández, A. & Blasco, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends Anal. Chem.* **32**, 40–59 (2012).
200. Baumann, J., Köser, J., Arndt, D. & Filser, J. The coating makes the difference: acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.* **484**, 176–84 (2014).
201. Giannaccini, M., Cuschieri, A., Dente, L. & Raffa, V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 703–719 (2014).
202. Nelson, S. M. *et al.* Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine* **6**, 93–102 (2010).
203. Pérez-Coll, C. S. & Herkovits, J. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food Chem. Toxicol.* **42**, 299–306 (2004).
204. Paisio, C. E., Agostini, E., González, P. S. & Bertuzzi, M. L. Lethal and teratogenic effects of phenol on *Bufo arenarum* embryos. *J. Hazard. Mater.* **167**, 64–8 (2009).
205. Tietge, J. E., Ankley, G. T., DeFoe, D. L., Holcombe, G. W. & Jensen, K. M. Effects of water quality on development of *Xenopus laevis*: A frog embryo teratogenesis assay-Xenopus assessment of surface water associated with malformations in native anurans. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2114–2121 (2000).
206. Hopkins, W. A. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR J.* **48**, 270–277 (2007).
207. Prati, M. *et al.* Ecotoxicological soil evaluation by FETAX. *Chemosphere* **41**, 1621–8 (2000).



208. Yslas, E. I. *et al.* Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere* **87**, 1374–80 (2012).

Hipótesis y objetivos



### 5.1. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de polianilina (PANI) provocan la muerte de las células tumorales de una manera eficiente a través de la terapia fotoasistida.

### 5.2. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, nanopartículas de PANI en distintos dispersantes para su aplicación en terapia fotoasistida, como tratamiento antitumoral.

### 5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar y seleccionar nanopartículas biocompatibles de polianilina para su aplicación en TFT.
- Evaluar la citotoxicidad en oscuridad y el efecto fototerapéutico de estas nanopartículas en líneas celulares tumorales en modelos de cultivos 2D y 3D (monocapa y esferoides, respectivamente).
- Determinar la toxicidad de nanopartículas de PANI *in vivo*, evaluando la actividad embrioletal a través del test AMPHITOX, en larvas y embriones de *Rhinella arenarum*.
- Realizar estudios toxicológicos con las Np-PANI en ratones Balb/c.
- Evaluar el efecto antitumoral de la TFT *in vivo* y la tolerancia de la terapia fototérmica en ratones Balb/c portadores de tumores.

## Materiales y métodos



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6. Materiales

#### 6.1. Medios de cultivos celulares

##### ➤ Medio de mantenimiento

Medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) 1X Invitrogen suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) Gibco, 1% v/v glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 0,5 % v/v piruvato (Hyclone®) y 10 % v/v antibiótico-antimicótico (Penicilina G 10 µg/ml - Estreptomicina 25 µg/ml - Anfotericina B - Gibco)

##### ➤ Medios de congelamiento

Dependiendo de la línea celular empleada se utilizó una solución de DMEM 1X suplementado con 10 % v/v de SFB, 1 % v/v de glutamina, 1 % v/v de antibiótico-antimicótico, 0,5 % v/v de piruvato de sodio y 10 % v/v de dimetilsulfoxido (DMSO, Sintorgan) como agente crioprotector. Otras veces, se empleó SFB y 10 % de DMSO.

#### 6.2. Soluciones

##### ➤ Buffer fosfato salino (PBS 1X)

ClNa	10 g
ClK	0,25 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O)	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	0,25 g
Agua bidestilada	1000 ml

##### ➤ Solución buffer de acetato-acético (0,1 M)

Acetato de Na	8,2 g
Ácido acético	5,72 ml

Agua bidestilada	500 ml
------------------	--------

➤ Solución stock de rojo neutro

Rojo neutro	40 mg
-------------	-------

PBS 1X	10 ml
--------	-------

Nota: Se puede conservar por varios meses a temperatura ambiente (20-30 °C) protegida de la luz.

➤ Solución decolorante de rojo neutro

Etanol 96 %	10 ml
-------------	-------

Ácido acético glacial	0,2 ml
-----------------------	--------

Agua bidestilada	10 ml
------------------	-------

➤ Solución de azul Tripán (0,4 %)

Azul Tripán	0,4 g
-------------	-------

PBS 1X	100 ml
--------	--------

➤ Solución de azul de Toluidina (0,05%)

Azul de Toluidina	0,05 g
-------------------	--------

Agua bidestilada	100 ml
------------------	--------

➤ Solución buffer de p-nitrofenilfosfato (APH)

Acetato de Na	0,1 M
---------------	-------

Tritón X-100	0,1 % v/v
--------------	-----------

p-nitrofenilfosfato	2 mg/ml
---------------------	---------

Nota: Se puede conservar por 2 – 3 meses a 4 °C protegida de la luz.

➤ Solución de azul de Evans (1 %)

Azul de Evans	1 g
---------------	-----

Agua bidestilada	100 ml
------------------	--------

➤ Solución de lisis celular

Dodecilsulfato sódico (SDS)	4 g
-----------------------------	-----

Agua bidestilada	100 ml
------------------	--------

➤ Solución para estrés oxidativo (DCFA 10 mM)

Diacetato de 2 '-7'- diclorodihidrofluoresceína	1 mg
--	------

DMSO	204 ul
------	--------

➤ Solución Ringer

ClNa	0,66 g
------	--------

ClK	0,015 g
-----	---------

Cl <sub>2</sub> Ca	0,015 g
--------------------	---------

CO <sub>3</sub> NaH	0,03 g
---------------------	--------

Agua bidestilada	100 ml
------------------	--------

➤ Solución de ácido tioglicólico (2 %)

Ácido tioglicólico (80% pureza)	5 ml
Agua bidestilada	185 ml
NaOH 1N	10 ml

➤ Solución anestésica

Ketamina (100 mg/ml)	0,15 ml
Xilacina (20 mg/ml)	0,15 ml
Acepromacina (10 mg/ml)	0,05 ml
Agua bidestilada	1,4 ml

### 6.3. Nanomateriales

#### 6.3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de polianilina

Se trabajó con nanopartículas de polianilina (Np-PANI), las cuales fueron sintetizadas en el laboratorio del Dr. C. Barbero con el cual existe una colaboración. Para sintetizar las Np-PANI se empleó la técnica de nucleación y polimerización oxidativa partiendo de monómeros de anilina<sup>1,2</sup>. Para lograr una mayor estabilidad en medios acuosos y evitar la precipitación de las nanopartículas se utilizaron diferentes polímeros estabilizadores como polivinilpirrolidona (PVP), poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAM), en distintos porcentajes p/v: PVP 2% y PVP 1% + PNIPAM 1% (figura 11). Estos polímeros se adsorbieron sobre las nanopartículas para crear el efecto de estabilización<sup>3</sup> y se eligieron debido a su biocompatibilidad<sup>4-7</sup>. Una solución 0,2 M de clorhidrato de anilina (Aldrich) se oxidó con peroxidisulfato de amonio 0,25 M (APS, Cicarelli) en presencia del estabilizador, 2 w w<sup>-1</sup> % (PVP) o 1 w w<sup>-1</sup> % (PVP +PNIPAM).



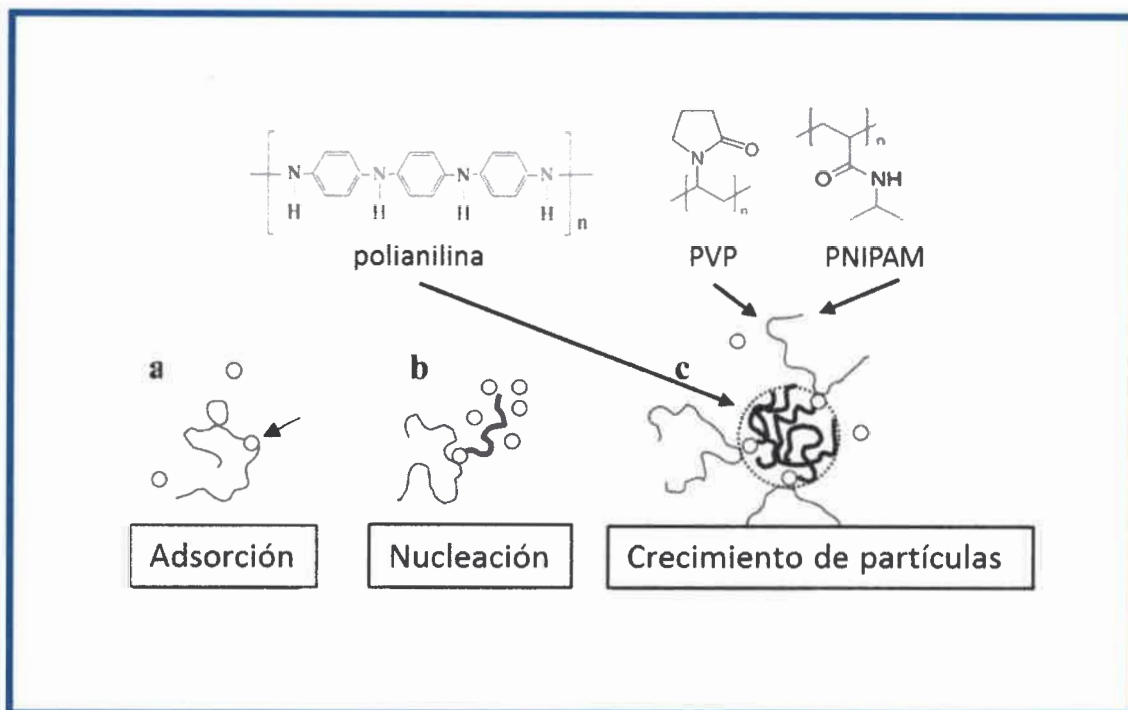


Figura 11: Método de síntesis descrito por Stejskal; El modelo de formación de partículas coloidales: a) oligómeros de anilina (círculos blancos) se adsorbe en la cadena de los polímeros estabilizadores (líneas finas negras) y b) se estimula el crecimiento de una cadena de PANI (línea gruesa negra) formando un núcleo de partícula. c) Otros oligómeros y nuevas cadenas de PANI se producen cerca del núcleo. Se forma la partícula coloidal. Esquema tomado y adaptado de referencia 8.

Las Np-PANI dispersadas en PVP 2% (Np-PANI 1) como aquellas dispersadas en PVP 1% + PNIPAM 1% (Np-PANI 2) se caracterizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), microscopia electrónica de transmisión (TEM), dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta. Para dicho fin, alícuotas de nanopartículas fueron depositadas sobre una rejilla revestida con grafito para análisis SEM y se dejaron secar para el análisis mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, Carl Zeiss Evo10MA). Para los estudios de TEM, alícuotas de nanopartículas se colocaron sobre una rejilla Formvar recubierta de cobre y se evaporaron lentamente a temperatura ambiente para posteriormente ser analizadas por un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1010). Por otra parte, el análisis del tamaño mediante DLS y potencial zeta de alícuotas de solución madre de nanopartículas como también de dispersiones en DMEM, PBS y solución Ringer se realizaron con el equipamiento Malvern Instruments, Zetasizer Nano S-90. Conjuntamente, se realizaron mediciones espectroscópicas UV-visible de las Np-PANI utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453x UV-Visible System.

#### **6.4. Sistema de irradiación**

Para realizar los experimentos de TFT, se utilizó un láser LED proveniente de una fibra óptica acoplada a sistema Raman System Inc. La fuente de luz proveniente del láser es monocromática y continua con una longitud de onda de 788 nm y una potencia fija de 500 mW/cm<sup>2</sup>. El diámetro del spot del láser es de aproximadamente 2 mm.

### **7. Metodología**

#### **7.1. Preparación de las diferentes suspensiones de Np-PANI**

Para determinar la concentración de Np-PANI en los distintos medio de cultivos empleados tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*, se realizó una curva de calibración con las suspensiones stock de las nanopartículas. Para ello, 4 alícuotas de 500 µl de las suspensiones stock de Np-PANI se colocaron en un recipiente previamente pesado y se deshidrataron en un horno de vacío a presión reducida. La masa del residuo sólido obtenida se calculó por diferencia y este peso se utilizó para estimar la concentración promedio (mg/ml) de Np-PANI en la solución stock inicial. Para construir la curva de calibración de absorbancias en función de concentración de nanopartículas; diferentes volúmenes de solución stock de Np-PANI se diluyeron en 5 ml de un buffer tampón pH 4 (acetato de sodio/ácido acético, 0,1 M) y la absorción de las diluciones resultantes se midió a 636 nm. El mismo procedimiento se realizó para las Np-PANI 2.

Se realizaron diluciones de la suspensión stock en medio de cultivo DMEM enriquecido con suero fetal bovino (SFB) 10%, glutamina, piruvato y la adición de antibiótico-antimicótico hasta obtener las concentraciones testeadas en los cultivos celulares (0,42 a 12 mg/ml).

#### **7.2. Producción de calor por absorción de la luz NIR**

Distintas suspensiones de Np-PANI en agua se colocaron en tubos de vidrio en agitación y luego se colocaron en una caja de poliestireno para evitar posibles fugas de calor. Se utilizó un láser NIR de estado sólido (Ocean Optics) que emite luz láser (785 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) a través de una fibra óptica cuyo extremo se colocó a 2 centímetros sobre la interfaz líquido/aire. Luego de varios intervalos de iluminación de las

suspensiones de Np-PANI; la temperatura producida se midió con un termómetro infrarrojo TES 1326S / 1327K.

### **7.3. Experimentos *in vitro* en líneas celulares tumorigénicas y normales**

#### **7.3.1. Cultivos celulares**

La línea celular principal con la que se realizaron la mayoría de los experimentos denominada LM2 (adenocarcinoma mamario murino) fue obtenida del instituto de oncología Dr. Angel Roffo. La misma se mantuvo en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino SFB (GIBCO), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – GIBCO), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (Penicilina G 10 ug/ml – Estreptomocina 25 ug/ml – Anfotericina B. GIBCO), 1 % v/v de piruvato de sodio (HYclone<sup>R</sup>), en una incubadora con 37°C de temperatura, 5 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera con humedad controlada. Para los experimentos de incorporación, citotoxicidad y ensayos fototerapéuticos se trabajó con cultivos de esta línea celular en monocapa (2D) con una confluencia del 90 – 100 %. Por otro lado, cuando se estudió la citotoxicidad y el efecto fototérmico de las Np-PANI en cultivos tridimensionales; se realizaron experimentos con esferoides obtenidos a partir de la misma línea celular.

Además, se trabajó con la línea celular CT26 (carcinoma de colon murina) y Hacat (queratinocitos humanos) para evaluar la citotoxicidad *per se* de las Np-PANI.

#### **7.3.2. Evaluación de la citotoxicidad *per se* de las Np-PANI**

##### **7.3.2.1. Ensayo de la viabilidad celular por MTT**

Con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas en oscuridad se estimó la viabilidad celular a través del ensayo colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio (MTT)<sup>9</sup>. Las células vivas poseen los componentes respiratorios mitocondriales funcionales para convertir el MTT en formazán. Por el contrario, las células muertas no poseen dicha actividad mitocondrial y por lo tanto no pueden realizar esta reacción.

Para la realización de este experimento, se sembraron 8000 células por pocillo, en placa de 96 pocillos. Luego se incubaron las células 24 horas con distintas suspensiones de Np-PANI: Para las Np-PANI 1 (0,42 mg/ml hasta 12 mg/ml) y para las Np-PANI 2 (0,5 mg/ml y 1,5 mg/ml); se retiraron las nanopartículas y se realizaron 2 lavados con

PBS 1X para eliminar las nanopartículas que no se hayan incorporado a las células. Luego se agregó 100  $\mu$ l de una solución de MTT en DMEM (1 mg/ml) y después de 2 horas de incubación a 37 °C, el medio fue remplazado por 100  $\mu$ l de DMSO para disolver los cristales de formazán (de color violeta). Posteriormente se analizó la densidad óptica de las muestras a  $\lambda$  540 nm. El porcentaje de supervivencia se expresó con respecto a la densidad óptica de placas controles (sin ningún tipo de tratamiento).

### ***7.3.2.2. Ensayo de la viabilidad celular por rojo neutro***

Se basa en la capacidad de células viables para incorporar y unir el colorante supravital rojo neutro. Este colorante débilmente catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas, donde se une por enlaces electrostáticos hidrófobos a los tensioactivos aniónicos y / o grupos fosfato de la matriz lisosomal<sup>10,11</sup>. Cuando la célula muere o el gradiente de pH se reduce, el colorante no puede ser retenido. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables<sup>12,13</sup>.

Luego de la exposición a Np-PANI 1 durante 24 horas, las células se incubaron por 2 horas con una solución colorante rojo neutro (100 mg/ml) en medio de cultivo (DMEM) sin suero. Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X. Posteriormente se les adicionó 1 ml de una solución de elución (EtOH / AcCOOH, 50% / 1%) para disolver los gránulos de colorante incorporados en las células, seguido de agitación suave durante 10 min de manera que se logró la disolución completa. La absorbancia de rojo neutro se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas. Los valores de absorbancia para pocillos no tratados se tomaron como referencia del 100% de viabilidad.

### ***7.3.2.3. Ensayo de la viabilidad celular por azul Tripán***

La viabilidad celular se evaluó también por un método colorimétrico de tinción por exclusión del colorante vital azul Tripán. En las células viables, el azul Tripán no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas y se colorean de azul. Para la realización de este experimento se utilizó una solución de azul Tripán 0,4 % en PBS 1X, la cual se mezcló en partes iguales con la suspensión de células que se obtuvo de las placas sembradas. Luego una alícuota de esta mezcla se colocó en una cámara de



Neubauer y se procedió al recuento de las células viables y no viables. Los resultados fueron expresados y estandarizados por 1 millón de células.

#### **7.3.2.4. Ensayo de formación de colonias**

Para confirmar la viabilidad celular después de la exposición a Np-PANI 1, se realizó un ensayo de formación de colonias o ensayo clonogénico<sup>14</sup>. Este ensayo evalúa esencialmente la capacidad de cada célula de una población para llevar a cabo el proceso de división "ilimitada" luego de ser sometidas a un tratamiento determinado que pueda afectar dicho proceso. Para ello, las células se cultivaron durante 24 h con suspensiones de Np-PANI 1 (0,42 mg/ml a 12 mg/ml). Luego se retiró el medio conteniendo las nanopartículas y se realizaron lavados con PBS 1X. Las células se trataron con tripsina y se recogieron para producir una suspensión de las mismas. Posteriormente, las células fueron re sembradas por triplicado a una densidad muy baja (200 células por pocillo) y se las dejó crecer hasta que se empezaron a observar colonias (10 días). Las colonias se definieron a partir de acúmulos de 50 células como mínimo. Finalmente, las colonias se fijaron con metanol en frío y se tiñeron con una solución de azul de toluidina (0,05 %) para realizar a continuación el recuento. Se supone que cada colonia se origina de una sola célula. La eficiencia de plaqueo (EP) de los cultivos controles se calculó como:

$$EP = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias formadas}}{n^{\circ} \text{ de células sembradas}} \times 100$$

El número de colonias que surgen después del tratamiento de las células, expresado en términos de eficiencia de plaqueo (EP), se llama la fracción sobreviviente (FS):

$$FS = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias formadas luego del tratamiento}}{n^{\circ} \text{ de células sembradas}} \times EP \times 100$$

#### **7.3.3. Incorporación celular de las Np-PANI**

Para evaluar la incorporación celular de las Np-PANI, se incubaron las células LM2 a 1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas con suspensiones de Np-PANI 1 de 0,42 mg/ml y 1,04 mg/ml y Np-PANI 2 de 0,5 mg/ml y 1,5 mg/ml. Luego de transcurrido los distintos



tiempos, se realizaron 2 lavados con PBS de las monocapas para eliminar las nanopartículas que no hayan sido incorporados por las mismas. Luego se procedió a levantar las células mecánicamente con una varilla y resuspenderlas en PBS 1X para posteriormente lisarlas con dodecilsulfato sódico (SDS) al 4%. Para evaluar la concentración de Np-PANI en las células LM2, se procedió a analizar el contenido de Np-PANI en el lisado celular, mediante espectrofotometría UV visible. Las concentraciones de Np-PANI expresadas por un millón de células, se determinaron por comparación con una curva de calibración obtenida a partir de dispersiones estándar de Np-PANI. El experimento se realizó por triplicado.

#### **7.3.3.1. Inhibición de la endocitosis**

Para determinar los efectos dependientes de la temperatura sobre la incorporación de Np-PANI en la línea LM2, las células se pre-incubaron durante 1 hora, ya sea a 4° C o 37° C y durante el tratamiento con nanopartículas. Las células fueron tratadas con Np-PANI 1 (1,04 mg/ml) durante 0,5 y 1 hora y finalmente se procesaron de la misma manera que en el experimento anterior para determinar la concentración de las nanopartículas en las células.

#### **7.3.4. Tratamiento fototérmico en cultivos 2D de células tumorales**

Para evaluar el efecto fototérmico de las Np-PANI sobre la línea celular LM2, se incubaron las células durante 3 horas con suspensiones de Np-PANI 1 en DMEM (0,42 y 1,02 mg/ml) y durante 3 y 24 horas con suspensión de Np-PANI 2 (0,5 y 1,5 mg/ml). Luego de retirar el medio con Np-PANI, se realizaron 2 lavados con PBS y se colocó nuevamente medio de cultivo DMEM con 10% SFB. Posteriormente se irradiaron las células con luz continua proveniente de un láser LED Raman System Inc. de una longitud de onda de 785 nm durante 10 y 15 min a una potencia fija de 500 mW/cm<sup>2</sup>. El spot del láser posee un diámetro de 2 mm aproximadamente. El mismo procedimiento sin irradiación fue realizado como un control de Np-PANI en oscuridad. También se evaluó si la exposición a la luz láser tenía algún efecto citotóxico en las células, para ello se irradiaron las células de igual manera a lo descrito anteriormente, pero sin el agregado de Np-PANI en el medio de cultivo. Además se evaluó si los dispersantes de las nanopartículas sumado a la irradiación podían tener algún efecto negativo en las células; para esto, se incubaron las células con soluciones de los dispersantes en DMEM en las

mismas concentraciones utilizadas con las nanopartículas siguiendo el mismo protocolo descrito. De estos tratamientos surgieron los siguientes controles: células tratadas con Np-PANI en oscuridad; células solamente irradiadas; células tratadas con el dispersante de las Np-PANI (PVP 2% y PVP 1% + PNIPAM 1%) sin irradiar e irradiadas y un control sin ningún tipo de tratamiento. Los cambios morfológicos celulares sobre el área de irradiación se compararon con los distintos controles utilizando un microscopio óptico invertido Nikon TS100.

#### ***7.3.4.1. Evaluación de las características morfológicas celulares***

Para evaluar cambios en el fenotipo morfológico de las células LM2 tratadas con TFT, se analizaron los cultivos bajo microscopía óptica invertida. Para lo cual, las células se sembraron sobre cubreobjetos y luego de someterlas a los diferentes tratamientos, se las fijó con metanol en frío durante 10 min y finalmente se tiñeron con una solución de azul de Toluidina 0,05%. Para analizar la morfología celular se utilizó un microscopio óptico invertido Nikon TS100.

#### ***7.3.4.2. Evaluación de las características morfológicas nucleares***

Con el objeto de analizar y comparar los efectos de los distintos tratamientos sobre la morfología nuclear de las células LM2, se empleó la técnica de tinción nuclear con el fluoróforo H $\ddot{o}$ echst 33258 y posterior visualización de los cambios nucleares bajo microscopía de fluorescencia. Para ello, las células se sembraron sobre cubreobjetos y se las sometió a los distintos tratamientos descritos en el experimento anterior. Luego las células se fijaron con metanol en frío (-20°C) durante 10 min; para posteriormente teñirlas con H $\ddot{o}$ echst (20  $\mu$ l/ml) durante 5 minutos. Finalmente, las células se lavaron con abundante PBS y se montaron sobre cubreobjetos para su posterior análisis.

Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50.

#### ***7.3.4.3. Determinación del estrés oxidativo pre y post TFT***

Teniendo en cuenta que los nanomateriales pueden inducir estrés oxidativo per se debido a la mayor área superficial en relación al volumen y por consiguiente una mayor

reactividad<sup>15-18</sup>, como así también con el fin de dilucidar la implicancia de especies reactivas del oxígeno (ROS) luego de la terapia fototérmica, se propuso evaluar el estrés oxidativo desencadenado por las Np-PANI antes y después del tratamiento fototérmico. Para dicho fin, se utilizó la sonda Diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFA). Esta es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para medir directamente el estado redox de una célula<sup>19,20</sup>. DCFA, es un precursor no fluorescente de diclorofluoresceína (DCF) que se puede utilizar como una sonda para medir el nivel de estrés oxidativo intracelular. Esterasas intracelulares escinden DCFA en los dos enlaces éster, produciendo un producto relativamente polar que no puede escapar de las células (H2DCF). Esta molécula no fluorescente se va acumulando intracelularmente y ante la presencia de ROS se genera DCF, producto altamente fluorescente.

Luego de incubar los cultivos en monocapa con las distintas suspensiones de Np-PANI, se procedió a incubar las células con una solución 10  $\mu\text{M}$  de DCFA en PBS 1X durante una hora. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se sometieron las células a la irradiación con luz NIR o se mantuvieron en condiciones de oscuridad. Por último se procedió a observar las células bajo microscopio de fluorescencia. Se utilizaron como controles células solamente irradiadas, células tratadas con los estabilizantes de las Np-PANI (PVP 2 % y PVP 1 % + PNIPAM 1 %) sin irradiar e irradiadas, células sin ningún tipo de tratamiento y como un control positivo células incubadas previamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ .

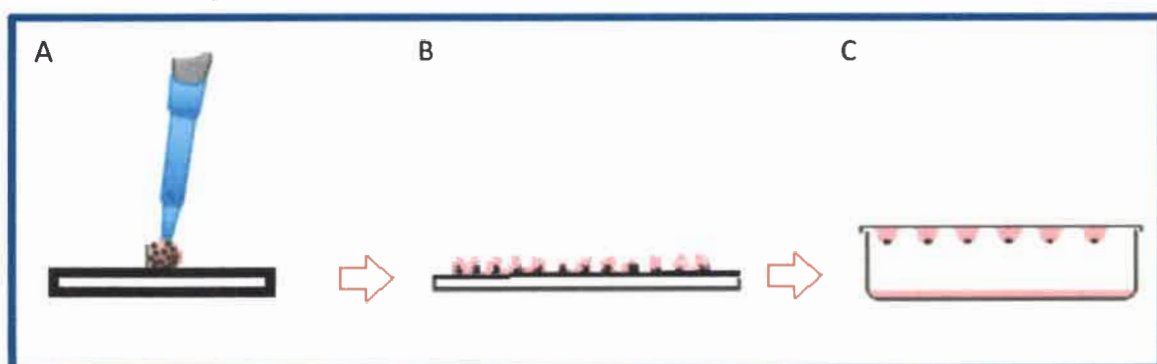
### 7.3.5. Modelo de cultivos tridimensionales: esferoides

Con el propósito de evaluar el efecto de la TFT *in vitro* en un modelo de cultivo más representativo de la arquitectura tumoral *in vivo* y de mayor complejidad, se implementó un modelo de cultivo 3D que nos permitiera realizar una mejor estimación de la eficacia antitumoral *in vivo* de las nanopartículas. Además con la implementación de este modelo, también se podrían evaluar otros parámetros que surgen de la interacción con una arquitectura tridimensional; como la difusión y la penetración de un compuesto o droga al interior del tumor. En lo que respecta a la TFT con Np-PANI, nos permitirá evaluar la penetración de la luz láser en el interior del tumor y la incorporación de las nanopartículas. Otra de las finalidades de la utilización de esferoides para evaluar la eficacia de la TFT fue la necesidad de emplear un modelo experimental que permitiera la



irradiación de la totalidad de células con el láser NIR y cuantificar la viabilidad celular post TFT.

Para la obtención de cultivos 3D (esferoides) se utilizó la técnica “hanging drop” o gota colgante<sup>21,22</sup>. Mediante esta técnica, se depositaron en una placa de Petri, gotas de medio de cultivo con distintas concentraciones de células (figura 12). Para determinar el número de células necesarias para formar esferoides correctamente se sembraron 10000 y 20000 células por gota. Las gotas de 30  $\mu$ l se colocaron en la tapa de una placa de Petri y luego al dar vuelta la tapa las células cultivadas quedaron suspendidas en las gotas. Transcurrido 72 horas se formaron los esferoides en la punta de la gota y posteriormente se transfirieron los esferoides a los distintos soportes donde se realizaron los experimentos, previamente la superficie del soporte se trató con una solución de agarosa 1%, la cual se dejó solidificar para evitar la adhesión de los esferoides al sustrato.



*Figura 12: Esquema representativo de la generación de esferoides; a) depósito de gotas en tapa de placa de Petri (30  $\mu$ l con 10000 células); b) cubrimiento de la superficie de la tapa con gotas en las cuales se formaran los esferoides y c) las gotas quedan colgando cuando se gira la tapa de la placa de Petri.*

#### **7.3.5.1. Tratamiento fototérmico en cultivos 3D (esferoides)**

Una vez obtenidos los esferoides, se procedió a transferir los mismos, un esferoide por pocillo, a una placa multipocillo p96. Los pocillos fueron tratados con anterioridad con 100  $\mu$ l de agarosa 1% en agua bidestilada hasta que la misma se solidificara. Este procedimiento se realizó con el propósito de evitar la adhesión de los esferoides al sustrato. Por tratamiento se utilizaron 5 esferoides por triplicado y el experimento se repitió 3 veces. Se utilizaron los siguientes tratamientos: esferoides tratados con Np-PANI1 y Np-PANI 2 en condiciones de oscuridad; esferoides solamente irradiados; esferoides tratados con el estabilizante de las Np-PANI (PVP 2% o PVP 1% + PNIPAM 1%) e irradiados y un control con esferoides sin ningún tipo de tratamiento. El tiempo de incubación con las Np-PANI fue de 3 y 24 horas, la dosis de luz utilizada fue la misma

que en el experimento con cultivos en monocapa. Cabe aclarar que la iluminación con el sistema laser se realizó por pocillo, asegurando la iluminación completa de cada uno de los esferoides tratados durante el tiempo necesario (15 min) para alcanzar la dosis de luz. Las concentraciones de Np-PANI testeadas correspondieron a 1,04; 2,08 y 4,16 mg/ml para Np-PANI 1 y a 1,5; 3 y 4,5 mg/ml para Np-PANI 2.

Luego de 24 horas post TTF se realizó la observación morfológica de los esferoides bajo microscopio óptico y se tomaron fotografías. Además, se procedió a realizar un test de medición de la viabilidad celular de los esferoides post terapia.

#### ***7.3.5.2. Ensayo de la viabilidad celular por fosfatasa ácida***

Con el objetivo de evaluar la viabilidad celular de esferoides post TFT se utilizó la técnica colorimétrica fosfatasa ácida. Este ensayo se basa en la cuantificación de la actividad de enzima fosfatasa ácida citosólica y fue validado para la determinación de la viabilidad celular en esferoides<sup>23-25</sup>. Esta es una técnica ampliamente utilizada para medir viabilidad celular en esferoides individuales debido a su alta sensibilidad y a que no es necesario disgregar los esferoides para realizar las mediciones. Fosfatasas ácidas intracelulares en células viables hidrolizan el sustrato p-nitrofenil fosfato y lo transforman en p-nitrofenol. La absorbancia de este compuesto a 405 nm es directamente proporcional al número de células en el rango de  $10^3$  a  $10^5$  en células en monocapa<sup>24</sup>. A las 24 horas post TFT se cosecharon los esferoides tratados y se colocaron en tubos Eppendorfs. Luego se procedió a centrifugar los mismos (10 min a 800 rpm), descartar el sobrenadante y resuspender los pellets en 100  $\mu$ l de PBS 1X. Posteriormente, se colocaron en un multipocillo 96 para lector de Elisa. A estos volúmenes se agregó 100  $\mu$ l del buffer conteniendo el sustrato de la reacción p-nitrofenilfosfato (2 mg/ml). Se incubó en estufa por 90 min y se detuvo la reacción química mediante el agregado de 10  $\mu$ l de una solución de NaOH 1N. Por último, se procedió a realizar la lectura de la densidad óptica en el lector de Elisa a  $\lambda$  405 nm.

#### **7.4. Experimentos *in vivo* en *Rhinella arenarum***

##### **7.4.1. Evaluación de la toxicidad de Np-PANI en *R. arenarum***

AMPHITOX es un conjunto de ensayos estandarizados adecuados para evaluar toxicidad aguda, a corto plazo, toxicidad crónica y malformaciones en los estadios primarios embrionarios y larvales de los anfibios de *Rhinella arenarum*<sup>26-29</sup>.

Para realizar este test se utilizaron larvas provenientes de ejemplares adultos de *R. arenarum*<sup>30</sup>. Los adultos de la especie, sapo común, se recolectaron en la zona de Río Cuarto (Córdoba) y se mantuvieron en jaulas ubicadas en un bioterio a temperatura ambiente, en un medio húmedo compuesto por arena y agua con alimentación 2 ó 3 veces por semana con hígado vacuno crudo.

##### **7.4.1.1. Obtención de las larvas por fecundación *in-vitro***

Para la obtención de embriones y larvas se realizaron fecundaciones *in vitro* de hembras de *R. arenarum* de aproximadamente 250 g. La inducción de la ovulación de las hembras, se realizó administrándoles dosis de 100 UI de Gonadotrofina Coriónica humana (GCh) (ELEA) por vía intraperitoneal 1 o 2 veces por semana por un lapso de 2 semanas; con lo cual se promovió la maduración de los ovocitos. Posteriormente se logró la ovulación de las hembras por inyección intraperitoneal de una hipófisis homóloga macerada de otra hembra más 300 UI de GCh. Las hembras desovaron (liberaron los óvulos) después de 10 a 15 horas. Estos óvulos se fecundaron *in vitro* con una suspensión de espermatozoides en solución Ringer 10 % en agua bidestilada. Los espermatozoides se obtuvieron de machos de la especie por extracción quirúrgica de ambos testículos y se realizó un macerado de los mismos. En bachas que contenían solución Ringer se mezclaron los óvulos y el macerado de testículos para llevar a cabo la fecundación *in vitro*. Los huevos fecundados y, posteriormente, los embriones permanecieron durante todo su desarrollo en placas de Petri con solución Ringer 10 %, la cual fue renovada diariamente para asegurar un correcto crecimiento y desarrollo. La determinación de los estadios de los huevos fecundados, embriones y larvas se hizo bajo lupa Nikon 54682 con un aumento de 2X, utilizando como referencia la guía de Del Conte y Sirlin (1952)<sup>31</sup>.

#### 7.4.1.2. Test de toxicidad aguda con larvas S.25

Los ensayos de toxicidad fueron realizados con larvas adultas en estadio 25 (S.25) (opérculo derecho e izquierdo cerrado) siguiendo las condiciones del test AMPHITOX. Se colocaron grupos de 10 larvas, por triplicado, en placas de Petri de 10 cm de diámetro, conteniendo 15 ml de las distintas suspensiones de Np-PANI o las soluciones controles. Estas soluciones fueron renovadas diariamente y se les suministró alimento para peces cada día, 1 hora antes de la renovación del medio. Las placas de Petri se incubaron tapadas durante 96 horas a una temperatura de  $25\pm 2$  °C, tiempo que dura el test agudo de exposición. Se evaluó cada 24 horas la mortalidad de las larvas, considerándose muerta aquella larva que no respondiera con alguna manifestación vital ante un leve estímulo mecánico. Además, se hicieron observaciones macroscópicas de las larvas tratadas y control, con el objetivo de detectar malformaciones o alteración del comportamiento.

Las distintas suspensiones de Np-PANI empleadas correspondieron a las siguientes concentraciones de Np-PANI 1: 0,18 - 0,53 - 0,83 - 0,98 - 1,24 - 1,4 y 1,55 mg/ml; y de Np-PANI 2: 0,15 - 0,5 - 1 - 1,25 y 1,5 mg/ml. Estas suspensiones fueron preparadas en medio Ringer y su concentración fue determinada por espectrofotometría UV-visible por comparación con una curva de calibración obtenida con suspensiones estándares de Np-PANI como se explicó anteriormente. Se utilizaron tres soluciones controles diferentes: (a) solución de Ringer 10 %, que se recomienda para las condiciones del ensayo AMPHITOX, (b) solución de PBS en Ringer, que es el medio líquido utilizado para preparar dispersiones de Np-PANI, y (c) PVP 2 % o PVP 1 % + PNIPAM 1% en PBS y sus respectivas diluciones que reflejan las concentraciones de los estabilizantes con las nanopartículas. Los resultados fueron expresados como porcentajes de mortalidad, al cabo de 96 horas de exposición.

#### 7.4.1.3. Test de teratogénesis

Para el ensayo de teratogénesis, se emplearon embriones de *R. arenarum* en estadios de 2 a 4 blastómeros (S.2-S.4). Luego de realizar la fecundación *in-vitro*, los huevos fecundados son retirados de la vaina de gelatina que los contiene. Esto se logró suspendiendo los embriones en una solución de ácido tioglicólico 2 % en PBS 1X a pH 7, en agitación constante durante 2 min. Luego de disolver esta vaina, los huevos son



lavados con solución Ringer 10 % y se procede a elegir aquellos huevos que se encuentren normales en los estadios de desarrollo de 2 a 4 células.

Se colocaron grupos de 10 embriones, por triplicado, en placas de Petri de 5 cm de diámetro, conteniendo 10 ml de las distintas suspensiones de Np-PANI o las soluciones controles. Estas soluciones fueron renovadas diariamente. Las concentraciones de NP-PANI 1 testeadas fueron: 0,15 - 0,18 - 0,53 y 1,24 mg/ml; mientras que para Np-PANI 2 fueron: 0,12 - 0,25 - 0,5 y 1 mg/ml. Las soluciones control utilizadas fueron las mismas a las descritas en el experimento anterior (solución de Ringer, PBS, y estabilizantes). Los embriones fueron incubados durante 96 horas en placas de Petri que se mantuvieron tapadas y a una temperatura de  $25\pm 2$  °C. Se evaluó cada 24 horas la presencia, el tipo y el porcentaje malformaciones (efectos subletales) como también el porcentaje de mortalidad (efectos letales) en el caso de que lo hubiera. Para evaluar el tipo de malformaciones producto de la exposición a Np-PANI o los polímeros estabilizantes; los embriones se observaron utilizando lupa binocular estereoscópica (Motic DM39). Los embriones muertos fueron retirados y la supervivencia fue evaluada cada dos días. Los ensayos teratogénicos se repitieron cuatro veces. Las malformaciones fueron identificadas de acuerdo al Atlas de malformaciones: A Guide for the Performance of FETAX<sup>32-34</sup>.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en cuanto a los efectos letales en S.25 como subletales en S.2-S.4 con las distintas concentraciones de Np-PANI, se pudo estimar mediante el software estadístico PROBIT: la concentración teratogénica 50 (CT50); concentración teratogénica 99 (CT99); la concentración no teratogénica (NOEC); concentración letal 50 (CL50); concentración letal 99 (CL99) y la concentración no letal (NOEC).

#### ***7.4.1.4. Acumulación, localización y excreción de Np-PANI en larvas S.25 de R.arenarum***

Para determinar el destino y acumulación de Np-PANI, 10 larvas S.25, por triplicado, se colocaron en placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro que contenían 15 ml de dispersiones de 0,5 mg/ml de Np-PANI 1 o Np-PANI 2 durante 96 horas. Posteriormente, las larvas se retiraron y cada grupo de larvas se lavaron con 50 ml solución de Ringer para descartar nanopartículas que hayan quedado adheridas al tegumento de las larvas, se secaron con papel de filtro, y se homogeneizaron en 100 ml

de N-metil-2-pirrolidona (NMP), donde PANI es soluble. El contenido de ambas dispersiones de nanopartículas (Np-PANI 1 y Np-PANI 2) se cuantificaron utilizando espectroscopia UV-visible. Los espectros UV-visible se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-vis 1601PC utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. El experimento se repitió por triplicado.

Por otro lado, diez larvas por triplicado (S.25) se colocaron en placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro que contenían 10 ml de una solución Ringer con comida para peces (control) o 10 ml de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 a una concentración de 0,5 mg/ml durante 24 horas. Luego, todas las larvas se lavaron suavemente con RS y se fijaron en una solución Bouin para su posterior análisis histopatológico. Estas muestras se sometieron a un proceso de deshidratación en orden ascendente en grados de alcohol para posteriormente ser embebidos en cera de parafina. Luego de este procesamiento se realizaron cortes con micrótopo hasta obtener secciones de 3 a 4 micras. Las secciones de tejidos fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) y se examinaron bajo un microscopio (Axiovert 135; Zeiss, Alemania) para sus estudios histopatológicos. Finalmente, se recolectaron las heces de los renacuajos de los distintos tratamientos y algunas se observaron bajo el microscopio y otras muestras se disolvieron en N-metil-2-pirrolidona (NMP) o etanol (EtOH) para determinar los espectros UV-visible tanto de heces de larvas control como de heces de larvas tratadas con Np-PANI 1 y Np-PANI 2.

## **7.5. Experimentos *in vivo* en ratones Balb/c**

### **7.5.1. Animales**

Se utilizaron hembras de ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (20 a 22 g de peso corporal) que se obtuvieron de la Fundación Balseiro (Buenos Aires, Argentina). Los ratones se mantuvieron en jaulas estándar con acceso a agua y alimento balanceado *ad libitum*. Todos los animales recibieron una buena atención de acuerdo a las normativas establecidas por la Disposición ANMAT N 6344/96, PP1-7 para el Cuidado Humano de los animales de experimentación. Los mismos fueron monitoreados diariamente para detectar signos de bienestar a través de la evaluación del apetito, del estado de hidratación y nivel de actividad corporal.

### **7.5.2. Funcionalidad hepática y renal**

Con el fin de determinar la toxicidad de Np-PANI 1 en ratones BALB/c, se realizaron estudios serológicos de parámetros bioquímicos que representan la funcionalidad hepática y renal. Estos estudios se realizaron empleando los siguientes kits de diagnóstico (Weiner, SAIC, Rosario, Argentina): creatinina directa, uremia y transaminasa glutámico-pirúvica GPT 200. Luego de la administración intravenosa (IV) de Np-PANI 1 (14,4 mg / kg de peso corporal); los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a 1 (n = 5), 3 (n = 5) y 7 días (n = 5) post tratamiento y se recolectaron muestras de sangre para obtener suero para las pruebas de funcionalidad. Para evaluar la función hepática, se midieron los niveles de la enzima transaminasa glutámico-pirúvica sérica (GPT), ya que los niveles elevados en suero de GPT generalmente se asocia con hepatotoxicidad. La función renal se monitoreó mediante la medición de los niveles séricos de creatinina y urea en suero.

### **7.5.3. Modelo tumoral en ratones Balb/c**

Para generar tumores en los ratones, se inyectó un millón de células LM2 en suspensión en PBS (200 µl) por vía subcutánea en la región del flanco superior derecho, previa depilación y realización de antisepsia de la zona. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 1 cm en diámetro exterior, se procedió a la extracción de alícuotas de 2 mm de tejido tumoral para la implantación por vía subcutánea en la región del flanco dorsal de los animales que se utilizarán en el experimento. Siete días después de la implantación, cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 4-5 mm de diámetro, se realizaron los tratamientos de terapia fototérmica. Cuando fue necesario, se anestesió a los animales utilizando una solución anestésica de clorhidrato de ketamina (Ketaject; phoenix farmacéutica, St. Joseph, MO, EE.UU.) 50 mg/kg peso corporal (pc), Acepromacina (Holliday-Scott, Sa, Buenos Aires, Argentina), 17 mg / kg de peso corporal y Xilazina clorhidrato (Bayer, Shawnee Mission, KS), 5 mg / kg de peso corporal. Dicha mezcla anestésica se administró a cada animal por vía intraperitoneal.

#### 7.5.4. Tratamiento fototérmico *in vivo*

Los ratones portadores de tumores se dividieron en 5 grupos ( $n = 8$ ). A los animales del grupo 1 se les administró intratumoralmente (IT) una solución de 1 mg/ml de Np-PANI 1 ( $50 \mu\text{l} \approx 3,64 \text{ mg/Kg pc}$ ) y luego de 3 horas se irradiaron con el mismo láser utilizado en los experimentos *in vitro* 15 minutos con una potencia de  $500 \text{ mW/cm}^2$  (figura 13). Los animales del grupo 2 recibieron una inyección IT de PVP ( $50 \mu\text{l}$ , 2% PVP disuelto en PBS) y luego fueron irradiados.

Los animales del grupo 3 solamente fueron irradiados. Los animales del grupo 4 recibieron una inyección IT de Np-PANI 1 mg/ml ( $50 \mu\text{l} \approx 3,64 \text{ mg/Kg pc}$ ) y no fueron irradiados. Finalmente, los animales del grupo 5 se utilizaron como grupo control inyectados IT con PBS 1X ( $50 \mu\text{l}$ ).

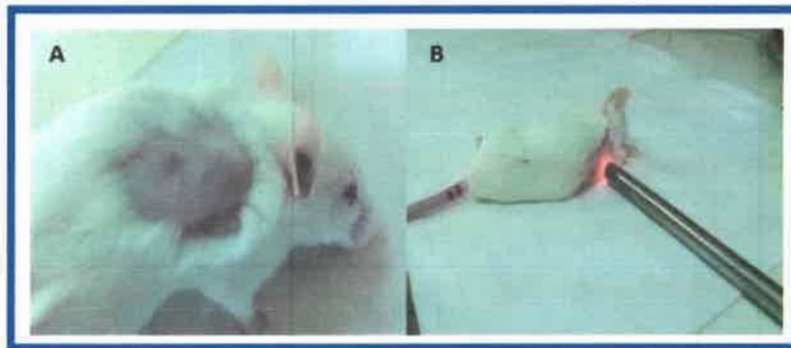


Figura 13: Formación de tumores y TFT en ratones; a) ratones Balb/c con tumores implantados en la región dorsal del flanco derecho. b) Tratamiento fototérmico con láser NIR 15 min luego de la aplicación IT de Np-PANI.

El volumen del tumor de cada ratón se monitoreó diariamente utilizando un calibre digital. Cabe aclarar que durante el experimento no se observó regresión espontánea de los tumores. El volumen tumoral ( $V$ ) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$V (\text{mm}^3) = L \times W \times H \times 0.5636$ , donde  $L$  es la longitud,  $W$  es el ancho y la  $H$  es la altura del tumor<sup>35,36</sup>.

#### 7.5.5. Estudios post terapia fototérmica en ratones portadores de tumores

##### 7.5.5.1. Viabilidad tumoral con tinción de azul de Evans

Para determinar el efecto fototerapéutico de las Np-PANI 1, se evaluó el grado de necrosis tumoral 24 horas después de la TFT empleando una tinción con azul de Evans de todos los animales tratados. Este colorante puede reflejar el daño del tumor post terapia ya que tiñe todo el tejido vivo de color azul; dejando las zonas de tejido muertas no



teñidas<sup>37,38</sup>. Se utilizaron ratones portadores de tumores; los cuales se agruparon de la siguiente manera: animales inyectados IT con PBS 1X 50 µl (control sin ningún tipo de tratamiento n = 6); ratones irradiados con láser NIR (control de luz n = 6); ratones inyectados con Np-PANI (3,64 mg/Kg IT) en condiciones de oscuridad (n=6); ratones inyectados con el dispersante PVP 2% e irradiados (n = 6); y ratones inyectados con Np-PANI (3,64 mg/kg IT) e irradiados (n = 6). Luego de 24 horas post TFT, se les administró 0,4 ml de una solución de azul de Evans 1 % por vía intraperitoneal, y a las 6 horas (para permitir la distribución del colorante) los animales fueron eutanasiados. Se extirparon los tumores pertenecientes a los ratones de cada grupo y se examinaron macroscópicamente. Posteriormente se cortaron secciones transversales de aproximadamente 2 a 3 mm de los tumores y se fotografiaron utilizando una cámara acoplada a una lupa binocular estereoscópica (aumento X4) para ser analizados con un software de imágenes (Motic Images Plus).

#### **7.5.5.2. Histopatología de órganos y tumores**

A otro grupo de ratones portadores de tumores se los dividió de acuerdo a los grupos tratamientos del experimento anterior y 10 días post TFT se les realizó eutanasia y se recolectaron muestras de órganos implicados en la depuración de xenobióticos como el hígado, riñón y bazo. También se recolectaron porciones de los tumores. Las muestras se fijaron en una solución buffer de formalina neutra al 4% y se sometieron a un proceso de deshidratación en orden ascendente en grados de alcohol para posteriormente ser embebidos en cera de parafina. Luego de este procesamiento se realizaron cortes con micrótopo hasta obtener secciones de 3 a 4 micras. Las secciones de tejidos fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) y se examinaron bajo un microscopio (Axiovert 135; Zeiss, Alemania) para realizar los estudios histopatológicos. Se tomaron fotografías de las muestras de tejidos con una cámara digital color (Axio Cam; Zeiss) empleando el software Motic Images Plus. El análisis histopatológico se llevó a cabo en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, bajo la supervisión de la Dra. Silvia Romanini.

### **7.5.5.3. Estudios de toxicidad de Np-PANI post TFT**

Con el fin de evaluar la tolerancia a la TFT por parte de los ratones portadores de tumores se procedió a realizar pruebas de funcionalidad hepática y renal, empleando los siguientes kits de diagnóstico (Weiner, SAIC, Rosario, Argentina): creatinina directa, uremia y transaminasa glutámico-pirúvica GPT 200. Para dicho fin, se extrajo sangre de los ratones pertenecientes a los cinco grupos de tratamiento del experimento anterior de 10 días post TFT en el mismo momento de la recolección de los tejidos por punción intracardiaca. De estas muestras de sangre se obtuvieron los sueros correspondientes y se analizaron mediante un autoanalizador de bioquímica sanguínea (A15 Biosystems).

### **7.6. Estudios estadísticos**

Todos los datos fueron analizados estadísticamente utilizando un análisis de la varianza ANOVA de una o dos vías según corresponda. Para comparar las medias de los resultados se utilizó un test a posteriori de Duncan, en todos los casos un p-valor  $< 0,05$  denota significancia. Para estimar estadísticamente las distintas concentraciones teratogénicas y letales se utilizó un test estadístico PROBIT.

Para analizar el crecimiento tumoral en el tiempo luego de la aplicación de TFT en los ratones portadores de tumores, se utilizó un modelo lineal general mixto en base a pruebas de verosimilitud, correlacionando los datos de los volúmenes tumorales temporalmente y modelando la heterogeneidad de varianza de las muestras. De varios modelos estadísticos empleados se eligió el más apto de acuerdo al criterio de medida de la calidad relativa de un modelo estadístico para un conjunto dado de datos: **criterio de información de Akaike (AIC)** y **criterio de información bayesiano (BID)**. Posteriormente, se utilizó el test de comparaciones múltiple de medias a posteriori “Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves” (DGC) para analizar la interacción de los distintos tratamientos por el tiempo.

## Bibliografía

1. Stejskal, J. & Sapurina, I. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **77**, 815 – 826 (2005).
2. Stejskal, J. & Proke, J. Reprotonated polyanilines : The stability of conductivity at elevated temperature. **102**, 67–73 (2014).
3. Joanny, J. F., Leibler, L. & De Gennes, P. G. Effects of polymer solutions on colloid stability. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **17**, 1073–1084 (1979).
4. Hayama, M., Yamamoto, K., Kohori, F. & Sakai, K. How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility? *J. Memb. Sci.* **234**, 41–49 (2004).
5. Kavanagh, C. A. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide) copolymer films as vehicles for the sustained delivery of proteins to vascular endothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **72**, 25–35 (2005).
6. Xu, F. J., Zhong, S. P., Yung, L. Y. L., Kang, E. T. & Neoh, K. G. Surface-active and stimuli-responsive polymer–Si(100) hybrids from surface-initiated atom transfer radical polymerization for control of cell adhesion. *Biomacromolecules* **5**, 2392–403 (2004).
7. Zhang, Q., Chen, L., Dong, Y. & Lu, S. Temperature-sensitivity and cell biocompatibility of freeze-dried nanocomposite hydrogels incorporated with biodegradable PHBV. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **33**, 1616–22 (2013).
8. Stejskal, J. & Sapurina, I. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **77**, 815–826 (2005).
9. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
10. Winckler, J. [Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red (author's transl)]. *Prog. Histochem. Cytochem.* **6**, 1–91 (1974).
11. Nemes, Z. *et al.* The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* **35**, 1475–1476 (1979).
12. Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro* **12**, 251–8 (1998).
13. Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–31 (2008).
14. Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–9 (2006).
15. Thounaojam, M. C. *et al.* Oxidative stress induced apoptosis of human lung carcinoma (A549) cells by a novel copper nanorod formulation. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 2990–6 (2011).

16. Usenko, C. Y., Harper, S. L. & Tanguay, R. L. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 44–55 (2008).
17. Choi, J. E. *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **100**, 151–9 (2010).
18. Kamat, J. P., Devasagayam, T. P., Priyadarsini, K. I. & Mohan, H. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* **155**, 55–61 (2000).
19. Royall, J. A. & Ischiropoulos, H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 348–55 (1993).
20. Wang, H. & Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 612–616 (1999).
21. Kunz-Schughart, L. a. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol. Int.* **23**, 157–61 (1999).
22. Kunz-Schughart, L. a, Freyer, J. P., Hofstaedter, F. & Ebner, R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J. Biomol. Screen.* **9**, 273–85 (2004).
23. Friedrich, J. *et al.* A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J. Biomol. Screen.* **12**, 925–37 (2007).
24. Yang, T. T., Sinai, P. & Kain, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal. Biochem.* **241**, 103–8 (1996).
25. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. a. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* **4**, 309–24 (2009).
26. Pérez-Coll, C. S. & Herkovits, J. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food Chem. Toxicol.* **42**, 299–306 (2004).
27. Brodeur, J. C., Svartz, G., Perez-Coll, C. S., Marino, D. J. G. & Herkovits, J. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat. Toxicol.* **91**, 161–70 (2009).
28. Hutler Wolkowicz, I. R., Aronzon, C. M. & Pérez Coll, C. S. Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *J. Hazard. Mater.* **263 Pt 2**, 784–91 (2013).
29. Herkovits, J., Perez-Coll, C. & Herkovits, F. D. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environ. Pollut.* **116**, 177–83 (2002).
30. Olmos, A. & Maneyro, R. *Bufo arenarum* Hensel, 1867 (Amphibia: Anura: Bufonidae) para el Noroeste del Uruguay. *Cuad. Herpetol.* **12**, 50 (1998).





31. DEL CONTE, E. & SIRLIN, J. L. Pattern series of the first embryony stages in *Bufo arenarum*. *Anat. Rec.* **112**, 125–135 (1952).
32. Bantle, J. A., Dumont, J. N., Finch, R. A. and Linder, G. Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX. *Stillwater Oklahoma State Publ.* (1991).
33. Bantle, J. & Sabourin, T. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *Am. Soc. Test. Mater. E1439* **98**, 1–20 (1991).
34. Mouche, I., Malesic, L. & Gillardeaux, O. FETAX assay for evaluation of developmental toxicity. *Methods Mol. Biol.* **691**, 257–269 (2011).
35. Whitacre, C. M., Zborowska, E., Willson, J. K. & Berger, N. A. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in response to treatment with topoisomerase I inhibitors: a potential surrogate end point to assess treatment effectiveness. *Clin. Cancer Res.* **5**, 665–72 (1999).
36. Whitacre, C. M. *et al.* Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2021–7 (2000).
37. Kostenich, G. a, Zhuravkin, I. N., Furmanchuk, a V & Zhavrid, E. a. Photodynamic therapy with chlorin e6. A morphologic study of tumor damage efficiency in experiment. *J. Photochem. Photobiol. B.* **11**, 307–18 (1991).
38. Schastak, S. *et al.* Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. *J. Photochem. Photobiol. B.* **78**, 203–13 (2005).

## Resultados y discusión

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de polianilina

La distribución del tamaño y la caracterización morfológica de Np-PANI 1 fueron determinadas por TEM, SEM (figura 14), DLS y potencial zeta (tabla 1). Las imágenes de SEM mostraron una morfología esférica de estas nanopartículas, con un tamaño promedio de 200 nm aproximadamente y una distribución homogénea de dicho tamaño. Un resultado similar se observó mediante el análisis del radio hidrodinámico de las nanopartículas obtenido por DLS (224 nm) con un índice de polidispersión (PII) de 0,145, el cual se mantuvo durante varias mediciones a lo largo del tiempo. Este resultado sugiere por un lado, un tamaño primario aceptable con una alta monodispersibilidad; como también, una buena estabilidad de las nanopartículas en términos de agregación y/o aglomeración. Por otra parte, la distribución del tamaño y la morfología de las Np-PANI 2 se analizaron mediante TEM, SEM (figura 15) y DLS y potencial zeta (tabla 1). Las imágenes de SEM mostraron una distribución de tamaño homogéneo, con un tamaño medio  $\bar{x} = 93.87 \text{ nm} \pm \text{SD} = 25.25$  calculado a través del análisis de fotografías utilizando el software Image J. El tamaño de las nanopartículas analizado por TEM resultó ser similar al obtenido por el SEM; aunque la morfología de tales nanopartículas no mostró una forma esférica regular como las Np-PANI 1. EL tamaño hidrodinámico de las Np-PANI 2 difirió significativamente con respecto al obtenido mediante las técnicas SEM y TEM. El mismo fue de 300 nm con un PII de 0,082 y esta diferencia podría atribuirse a la pérdida de la capa de hidratación que rodea a las nanopartículas debido al procesamiento (desechado) de las muestras de Np-PANI 2 para el análisis mediante SEM y TEM. La capa de hidratación que se forma alrededor del núcleo de las nanopartículas es el producto de la interacción de los polímeros estabilizantes anfífilicos con moléculas del solvente (agua). Las Np-PANI 2 están estabilizadas con PNIPAM, el cual se comporta como un hidrogel termosensible y por lo tanto puede hacer variar el tamaño de las nanopartículas en presencia de agua.

El potencial zeta en el medio acuoso (agua) de diferentes muestras de PANI-Np 1 tuvo un valor promedio de -7,58 mV y para las Np-PANI 2 de -6,07 mV. Por lo tanto, ambos tipos de dispersiones de PANI tuvieron una carga neta superficial neutra y esta característica se pueden atribuir a la presencia de PVP, el cual es un polímero neutro<sup>1</sup>.

Ambos tipos de dispersiones de nanopartículas (Np-PANI 1 y Np-PANI 2) resultaron ser estables durante muchos meses en medios acuosos tales como: soluciones electrolíticas como PBS y el medio de cultivo de las células (DMEM), lo que resultó muy favorable al momento de realizar los distintos experimentos. Cuando las nanopartículas comenzaron a aglomerarse y sedimentar, el sonicado de las suspensiones restauró la estabilidad de las dispersiones en los distintos medios.

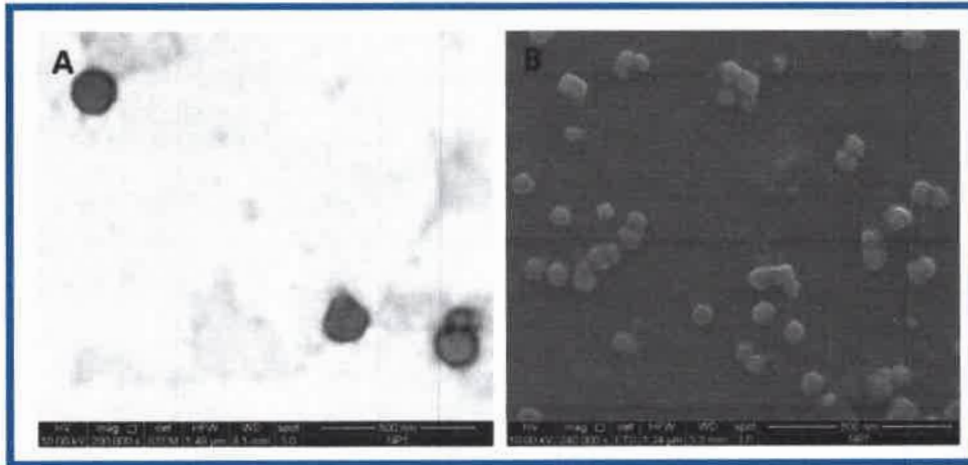


Figura 14: Tamaño y distribución de Np-PANI 1 obtenido mediante a) microscopía electrónica de transmisión (TEM) y b) microscopía electrónica de barrido (SEM).

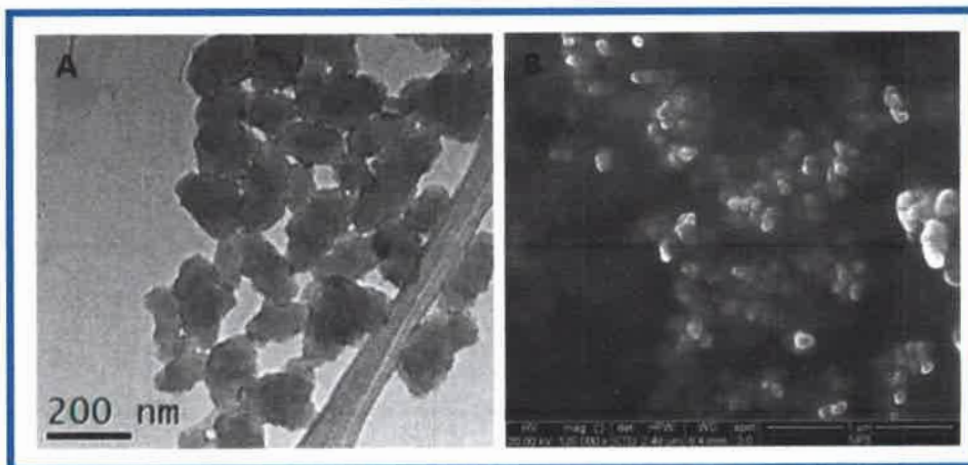


Figura 15: Tamaño y distribución de Np-PANI 2 obtenido mediante a) microscopía electrónica de transmisión (TEM) y b) microscopía electrónica de barrido (SEM).

De acuerdo al espectro de absorción UV-visible de las distintas Np-PANI se pudo observar que los máximos picos de absorción de las Np-PANI cambian con respecto al pH del medio en donde se encuentren dispersas. La figura 16 muestra el espectro UV-vis de Np-PANI en el estado dopado de esmeraldina ácida (pH= 5) y en el estado sin dopar de esmeraldina básica (pH= 7). En el espectro de pH= 7 es posible observar las tres bandas



características de las Np-PANI en  $\lambda$  290, 366, y 627. En el espectro de pH= 5 es posible observar las tres bandas características en  $\lambda$  320, 430, y 780 nm. El pico de absorción en  $\lambda$  320 nm se atribuye a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo de anilina y la banda en  $\lambda$  430 nm se asigna a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del catión radical localizado. Por otra parte, la banda a  $\lambda$  780 nm se atribuye a la excitación desde el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) de los anillos bencénicos (pb) al orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) de los anillos quinoides (PQ) en las unidades de quinonimina. Este comportamiento es característico del polímero conductor y electroactivo PANI<sup>2,3</sup>.

Tabla 1: Caracterización de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 mediante DLS y potencial zeta

	Díámetro hidrodinámico (DLS)	Índice de polidispersión (Pdl)	Potencial Zeta (mV) pH= 5
Np-PANI 1	224	0.145	-7.58 ± 0.54
Np-PANI 2	308.7	0.082	-6.07 ± 0.44

En la forma de sal esmeraldina acida; el máximo pico de absorción de la tercera banda correspondiente a los anillos quinoides se desplaza a la región NIR dentro del espectro de luz UV-visible. Por lo tanto, las Np-PANI en un medio ácido absorben luz en el rango NIR (700-1200 nm) y teniendo en cuenta que varios tumores sólidos (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, sarcoma de tejido blando, y el melanoma maligno) tienen un rango de pH entre 5,7 y 7,8<sup>4-6</sup> es posible activar las nanopartículas por irradiación con luz NIR. A partir de estos resultados, se propuso la utilización de esta banda de absorción de las Np-PANI para la fotoactivación con el láser NIR de 785 nm. La irradiación con una fuente de luz dentro de esta región del espectro NIR se considera una ventana terapéutica con ventajas prometedoras con respecto a otras terapias fotoasistidas. Esto es debido a que la absorción de luz por los tejidos y fluidos en la región NIR es casi nula; por ejemplo moléculas presentes normalmente en los tejidos vivos como hemoglobina, melanina y el agua misma presentan poca o nula absorción de luz y por lo tanto la penetración de la luz es mucho mayor<sup>7-11</sup>.

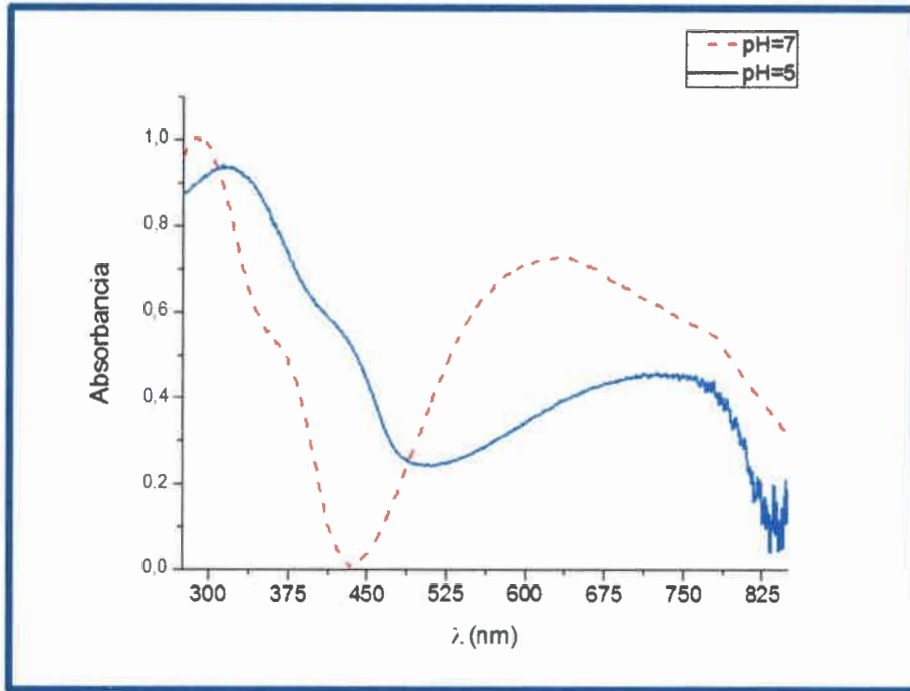


Figura 16: Espectro UV-visible de Np-PANI en solución a distintos pH.

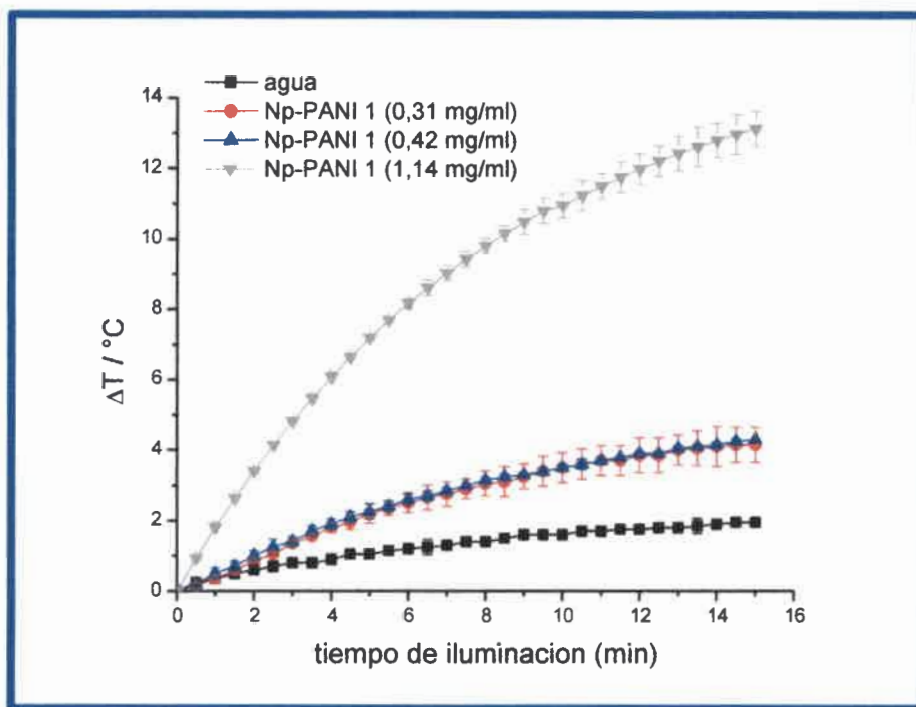


Figura 17: Variación de temperatura ( $\Delta T$ ) de Np-PANI 1 en solución a diferentes tiempos de irradiación con el láser NIR.

Los cambios de temperatura de diferentes concentraciones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 fueron testeados en dispersiones en agua, luego de ser sometidas a la irradiación con luz láser NIR a la potencia fija de 500 mW durante distintos tiempos. La figura 17

muestra el cambio de temperatura ( $\Delta T$  (°C) =  $T_f - T_{rt}$ ) desde la temperatura ambiente ( $T_{rt}$ ) a la temperatura luego de la irradiación ( $T_f$ ) para las Np-PANI 1. Una dispersión Np-PANI 1 de 0,167 mg/ml producen un incremento de 3,5 °C, mientras que una dispersión de 0,419 mg/ml en un medio ácido (pH 5) provocó un incremento de 4 °C. Una concentración mucho mayor (1,04 mg/ml) incremento la temperatura en más de 12 °C. Se observó un aumento de temperatura dependiente de la concentración de nanopartículas como también del tiempo de irradiación con el láser NIR. Por otro lado, en la figura 18 se graficaron los cambios de temperaturas para distintas dispersiones de Np-PANI 2 luego de la irradiación empleando el mismo laser a distintos tiempos. Con estas nanopartículas se alcanzaron aumentos de temperatura mayores comparado a las Np-PANI 1 producto de utilizar mayores concentraciones en las dispersiones testeadas.

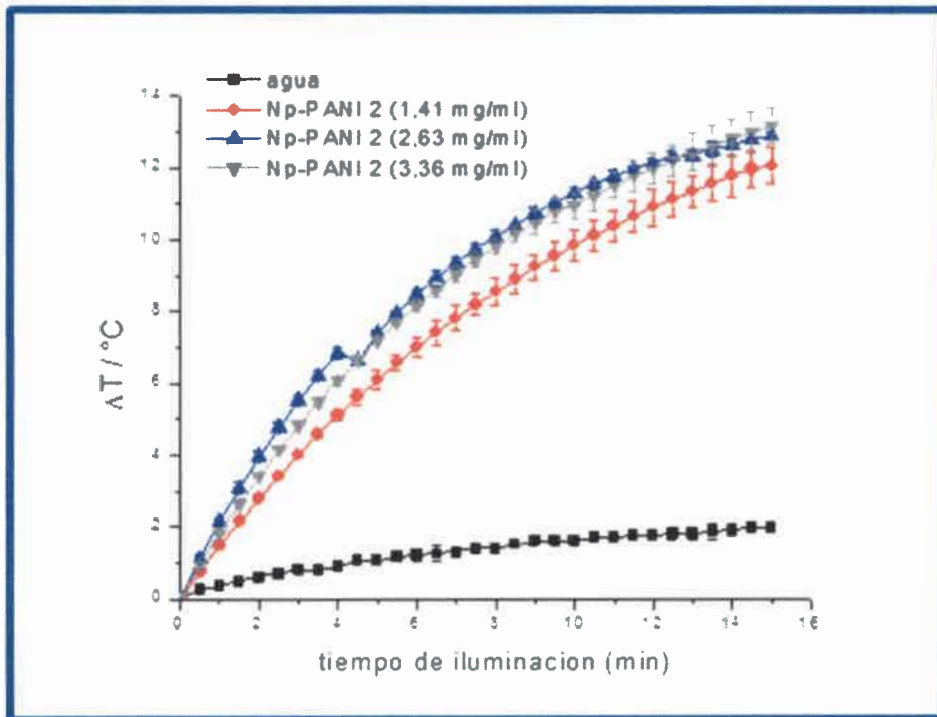


Figura 18: Variación de temperatura ( $\Delta T$ ) de Np-PANI 2 en solución a diferentes tiempos de irradiación con el láser NIR.

El aumento de la temperatura alcanzado en el medio líquido donde se encontraban las nanopartículas fue significativamente superior con respecto al control para ambas dispersiones. Nuestros resultados sugieren que concentraciones mínimas de 0,33 mg/ml alcanzadas en las células tumorales serian suficiente para lograr el efecto fototérmico.

Para determinar la concentración de nanopartículas de PANI para posteriores ensayos, se correlacionó la absorción de distintas dispersiones de nanopartículas, en función de la concentración del polímero PANI. A diferencia de la determinación

gravimétrica, que está muy afectada por la humedad en las muestras, la medición de la absorción óptica es más fácil y se necesitan cantidades mucho más pequeñas de las muestras. Cuando se midió el espectro de absorción a pH fijo, en un buffer de acetato acético 1M, la absorbancia en una determinada longitud de onda puede ser tomada como una medida aproximada de la cantidad de PANI en la dispersión.

La concentración de PANI se determinó a partir de la masa sólida obtenida luego de la deshidratación de una alícuota de la dispersión stock y después de restar la masa conocida de los polímeros estabilizantes introducidos en el sistema. La concentración de polianilina en la dispersión coloidal se calculó a partir de la absorbancia a la longitud de onda determinada mediante el uso de la ley de Lambert-Beer,  $A = \epsilon cl$ , obteniendo una dependencia lineal para ambas Np-PANI (figura 19). La estimación del coeficiente de absorción se pudo determinar a través de su pendiente como  $e = 2,97 \pm 0,01 \text{ SEM cm}^3 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  de PANI para las Np-PANI 1 mientras que para las Np-PANI 2 fue de  $e = 1,31 \pm 0,01 \text{ SEM cm}^3 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  de PANI. El coeficiente de absorción se expresa sobre la base de masa debido a la limitancia para definir la masa molar de la unidad de cromóforo del polímero PANI.



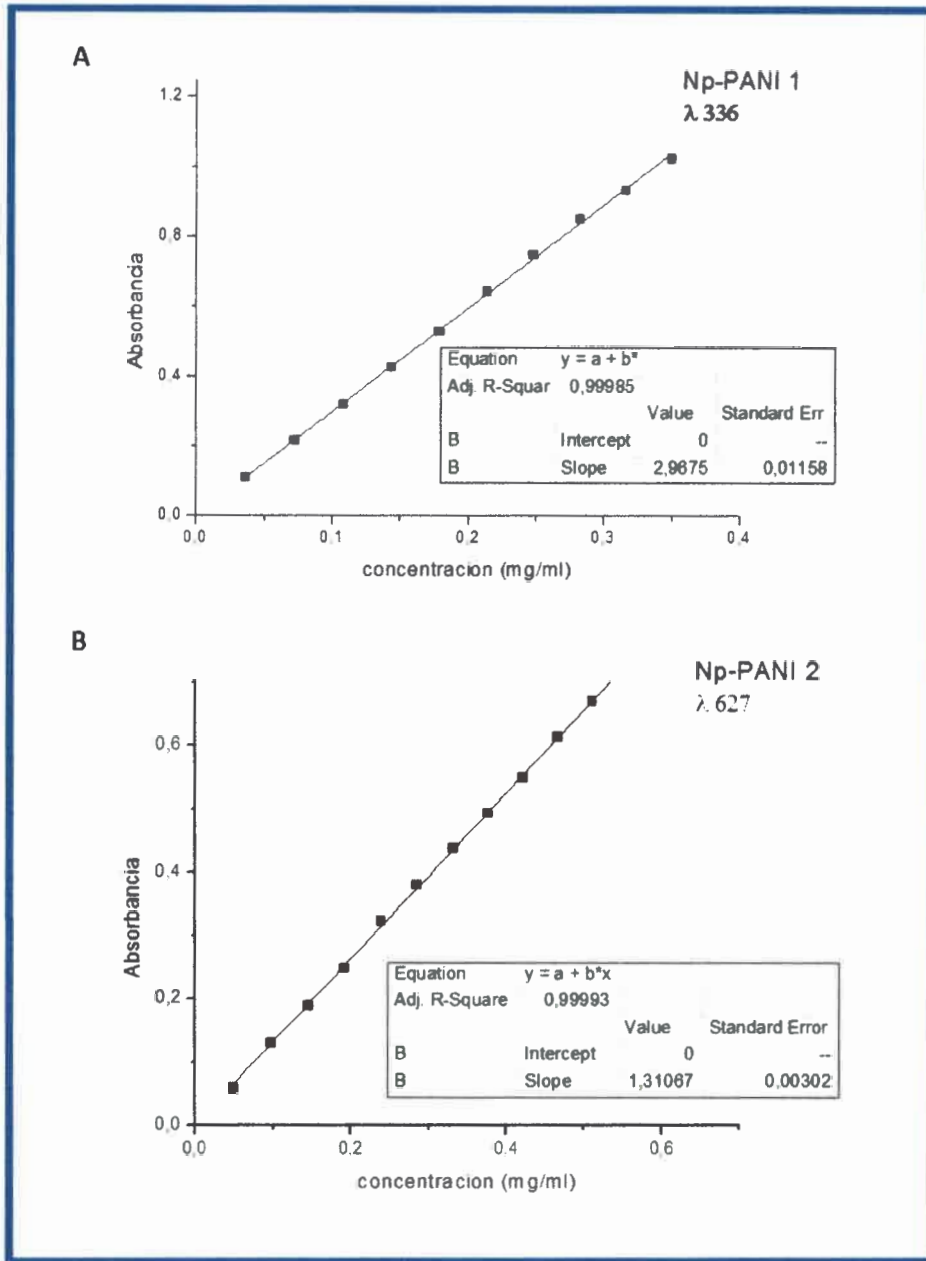
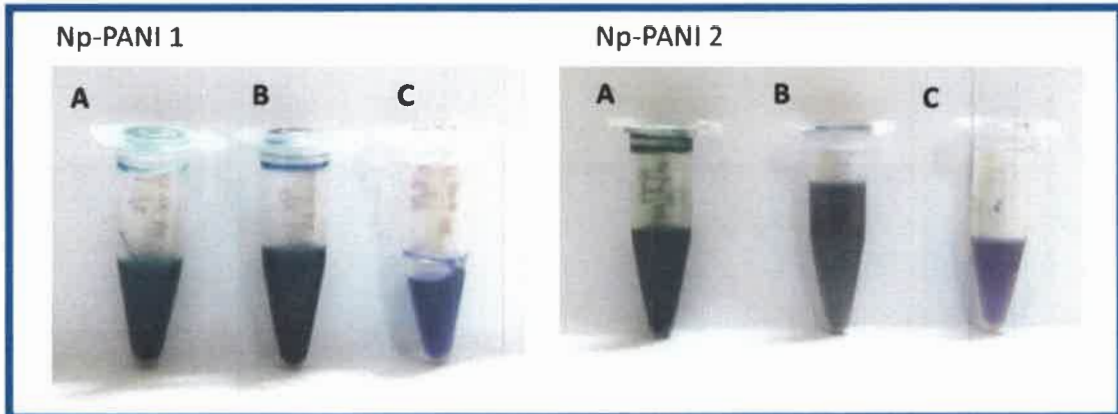


Figura 19: Curvas de calibración de a) Np-PANI 1 y b) Np-PANI 2 en buffer acetato de Na/ácido acético 1M.

Por otro lado, testeamos la estabilidad de ambas dispersiones de Np-PANI en distintos medios acuosos, los cuales fueron empleados en los experimentos con cultivos celulares y larvas de *R. arenarum* (PBS 1X, DMEM 10% SFB, Ringer 10%). Este es un parámetro importante al momento de diseñar nanopartículas con futuras aplicaciones farmacológicas, debido a que nanopartículas de diferentes materiales no forman soluciones en medios acuosos, sino suspensiones coloidales. Por lo tanto la estabilidad de las partículas en el medio líquido, está fuertemente influenciada por la composición del

medio (donde la presencia de sales electrolíticas y/o proteínas del suero juegan un rol importante). La mayoría de las nanopartículas no están desarrolladas para ser compatibles con ensayos biológicos en los que se utilizan soluciones isotónicas a pH fisiológico y a menudo en presencia de proteínas<sup>12,13</sup>. En cuanto a ambas Np-PANI, pudimos determinar la estabilidad de las partículas en los distintos medios por más de varios meses sin observarse signos de aglomeración y/o precipitación de las mismas (figura 20).



*Figura 20: Dispersiones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en: a) PBS 1X 200 mg/ml de PANI; b) solución de Ringer 10% en PBS 100 mg/ml de PANI y c) DMEM con SFB 10% 1 mg/ml de PANI. Estas suspensiones se mantuvieron por varios meses sin que se observe aglomeración y/o precipitación de las nanopartículas.*

## **8.2. Experimentos *in vitro* en líneas celulares tumorígenicas y normales**

### **8.2.1. Evaluación de la viabilidad celular de cultivos incubados con Np-PANI en oscuridad**

Distintos ensayos de viabilidad se emplearon para evaluar la toxicidad general dependiente de la concentración de Np-PANI en cultivo de células, testeando diferentes organelas celulares y sus funciones. Para ello, se incubaron células de la línea LM2 con dos concentraciones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2. Luego de 24 horas se determinó la supervivencia de las células por exclusión del colorante vital azul Tripán (figura 21). Este método evalúa la integridad de la membrana y permite el recuento de células no viables, ya que solamente éstas se tiñen de una coloración azulada.

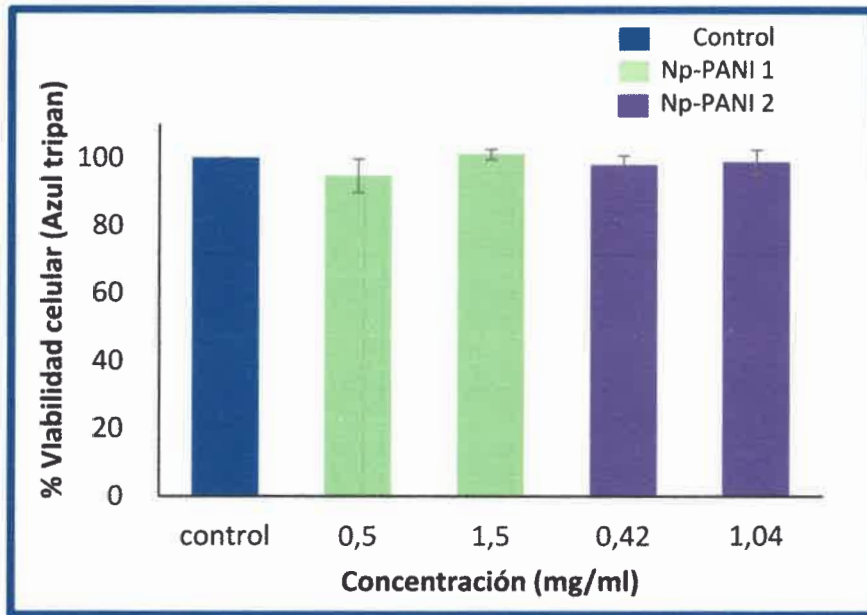


Figura 21: Efecto de la exposición a NP-PANI 1 y Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2 mediante la técnica de exclusión de azul tripan. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad celular respecto al grupo control. Con respecto a las Np-PANI 1, la viabilidad fue de 98,66 %  $\pm$  3,67 y 97,87 %  $\pm$  2,7 para las concentración de 0,42 y 1,04 mg/ml, respectivamente. Mientras que para las Np-PANI 2, los porcentajes de viabilidad fueron de 101,07 %  $\pm$  1,7 y 94,7 %  $\pm$  4,9 para las concentraciones 0,5 y 1,5 mg/ml, respectivamente. La viabilidad de las células tratadas no presentaron diferencia estadísticamente significativas con respecto a la de las células controles.

Por otro lado, se evaluó la viabilidad celular luego de 24 horas de incubación con las Np-PANI 1 y Np-PANI 2 por la técnica colorimétrica MTT (figura 22). El ensayo MTT permite evaluar la viabilidad celular basada en la funcionalidad mitocondrial.

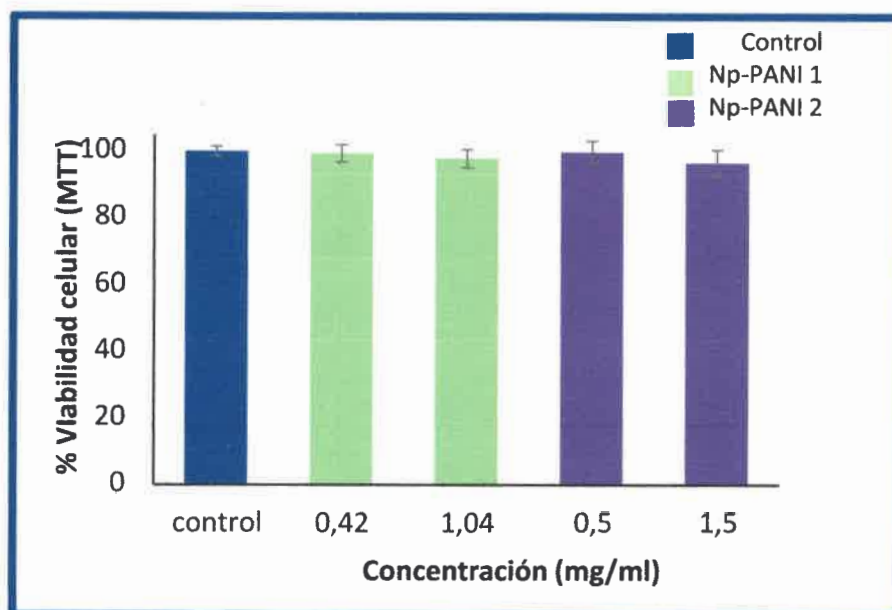


Figura 22: Efecto de la exposición a NP-PANI 1 y Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2 mediante la técnica MTT. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

La viabilidad celular estimada mediante este ensayo, en las concentraciones utilizadas de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación no mostró diferencias estadísticamente significativa con respecto al control.

Los resultados obtenidos en los dos ensayos de viabilidad celular, indicarían que ambas dispersiones de Np-PANI no son citotóxicas en condiciones de oscuridad en la línea celular LM2 a las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, estas nanopartículas podrían ser candidatas para posteriores ensayos de fotoirradiación en cultivo celular a las concentraciones mencionadas.

Con el fin de determinar la  $DL_{50}$  en cultivos celulares expuestos a Np-PANI por un periodo de 24 horas, se evaluaron concentraciones más elevadas (0 – 12 mg/ml) empleando además de la línea celular LM2, otras líneas celulares tumorales y normales (CT26 y HacaT, respectivamente). Estos resultados se obtuvieron mediante la técnica MTT e incorporación de Rojo Neutro. Si las células metabolizan correctamente el colorante MTT, el cultivo celular se tornará azul, lo que permite la cuantificación de la actividad mitocondrial por medidas de absorbancia. Por otra parte, la incorporación de rojo neutro y consiguiente unión a los lisosomas está íntimamente relacionado con la funcionalidad de estas organelas y por lo tanto también refleja la supervivencia celular al tratamiento.

La viabilidad celular se redujo significativamente de una manera dependiente de la concentración luego de la exposición a las nanopartículas en todas las líneas celulares



con ambos test utilizados (figura 23a y b). Aunque se observaron diferentes sensibilidades de acuerdo a la línea celular utilizada. Se encontró una mayor susceptibilidad a la exposición a Np-PANI por parte de las líneas celulares tumorales, mientras que la línea HaCaT resulto ser más resistente. A partir de 3 mg/ml de Np-PANI 1 se evidenció un efecto tóxico significativo en esta línea, mientras que la viabilidad celular de las líneas tumorales LM2 y CT26 disminuyó significativamente a partir de concentraciones > a 1,5 mg/ml.

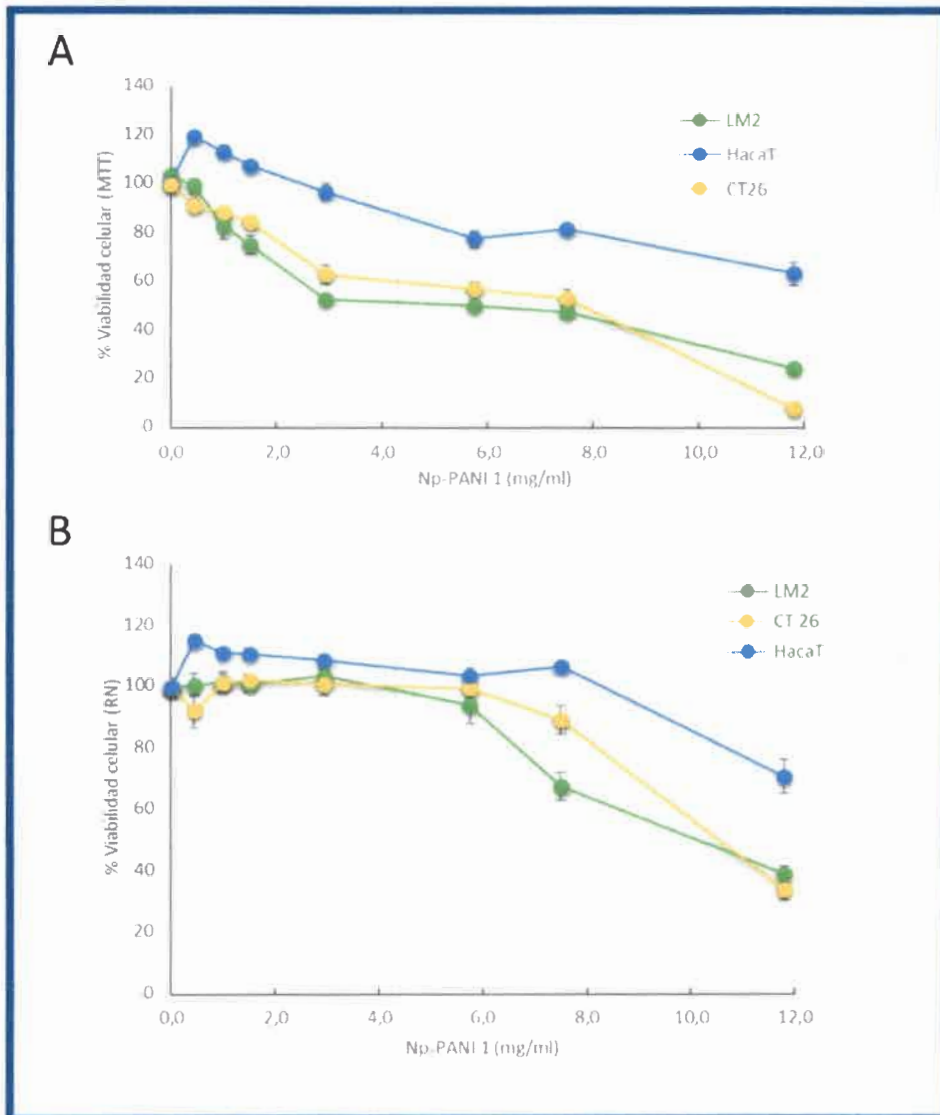


Figura 23: Efecto de la exposición a NP-PANI 1 luego de 24 horas de incubación sobre la viabilidad de células LM2, CT26 y HaCaT mediante la técnica MTT (a) y rojo neutro (b). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

Por otro lado, se puede observar que la toxicidad varió en función del test empleado para su medición. Esta diferencia puede estar relacionada con los distintos



componentes celulares que evalúan las técnicas<sup>14-16</sup>. Otro factor a considerar es que las nanopartículas pueden interactuar con los componentes o drogas empleados en los ensayos de viabilidad y de esta manera interferir con los sistemas de detección sobretodo en el caso de ensayos colorimétricos (MTT y rojo neutro); lo cual resulta en datos menos fiables<sup>12,17,18</sup>. Como se puede ver en los gráficos de citotoxicidad (figura 23a y b); a concentraciones bajas de Np-PANI se observan porcentajes de supervivencia por arriba de los grupos controles alcanzando casi un 20 % por encima del 100 %. En el caso de las células LM2, la DL50 establecida por el método de MTT fue de 7,5 mg/ml; en comparación con la DL50 de 11,8 mg/ml determinada por el ensayo rojo neutro. El ensayo de incorporación del colorante rojo neutro estaría sobreestimando la viabilidad celular y ésta interferencia puede deberse a la localización lisosomal de las nanopartículas aunque esto no fue experimentalmente demostrado. Si bien se conoce por literatura que muchos nanomateriales tienen un destino vesicular y/o lisosomal<sup>19</sup>.

Con el fin de determinar qué ensayo colorimétrico representa una mejor medida de la supervivencia celular después de la exposición a las nanopartículas de PANI; se realizó un ensayo clonogénico (figura 24). Este ensayo se basa en la capacidad que posee una sola célula de proliferar y formar una colonia después de recibir un tratamiento determinado; lo cual refleja la viabilidad celular. La exposición a una concentración de 0,45 y 1 mg/ml de Np-PANI 1 no disminuyó la viabilidad celular en las células LM2 en comparación con células sin ningún tratamiento. La concentración mínima testeada de Np-PANI que disminuyó significativamente la viabilidad celular (71,7 %) fue de 2,94 mg/ml, mientras que una concentración mayor (7,5 mg/ml) disminuyó la viabilidad celular en un 39 %. La concentración más elevada testeada (11,8 mg/ml) directamente no permitió la formación de colonias en las células LM2. Los resultados de este estudio demostraron que el ensayo de MTT se podría implementar como una herramienta eficaz, sensible y más confiable para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas PANI en cultivos celulares.

Según Kucekova y col.<sup>20</sup> los efectos citotóxicos a la exposición de Np-PANI 1 por 24 horas en la línea celular HaCaT, comienzan a concentraciones  $\geq 0,345$  mg/ml mientras que en nuestro estudio las células HaCaT serían resistentes a la exposición de Np-PANI hasta concentraciones de 3 mg/ml aproximadamente. Como se puede observar nuestros

resultados difieren significativamente en cuanto a las concentraciones a partir de las cuales comienzan los efectos tóxicos.

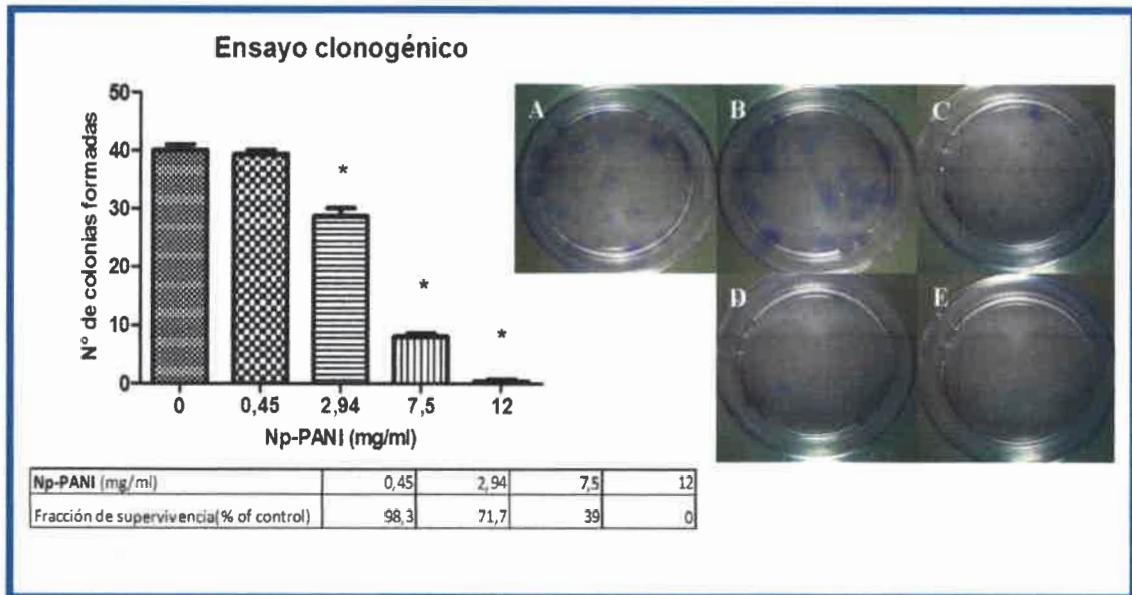


Figura 24: Ensayo de formación de colonias con células LM2 luego de la exposición a Np-PANI durante 24 horas. El número de colonias formadas se adaptó al % de supervivencia de acuerdo a la fórmula de fracción de colonias supervivientes.

### 8.2.2. Incorporación celular de Np-PANI

Con el objetivo de evaluar la incorporación de las Np-PANI en células tumorales, se cultivaron las células LM2 con ambas concentraciones de las Np-PANI 1 y Np-PANI 2 utilizadas en el experimento anterior. Luego de diferentes tiempos de incubación; se procedió al análisis de la concentración de Np-PANI en las células mediante espectrofotometría UV-visible (figura 25). En las concentraciones de 1,5 y 0,5 mg/ml para Np-PANI 2 como en las concentraciones de 0,42 y 1,04 mg/ml para Np-PANI 1 se observó una cinética de incorporación similar. Se alcanzó el plateau para ambos tipos de dispersiones a tiempos cortos de incubación (3 horas para las Np-PANI 1 y 6 horas para las Np-PANI 2). La máxima concentración de Np-PANI 1 dentro de las células LM2 se obtuvo a las 3 horas post incubación; siendo de 0,33 mg/ml para la concentración de 1,04 mg/ml y de 0,07 mg/ml para la concentración de 0,42 mg/ml. Mientras que, para las Np-PANI 2; estas concentraciones máximas alcanzadas intracelularmente, expresadas por 1 millón de células, se alcanzaron a las 6 horas postincubación. Las mismas fueron de 0,52 mg/ml para la concentración de 1,5 mg/ml y 0,21 mg/ml para la concentración de 0,5 mg/ml. De acuerdo a estos resultados, las Np-PANI 2 se incorporarían en mayor cantidad

en las células con respecto a las Np-PANI 1; aunque no es preciso afirmar que la ubicación de las mismas sea intracelular o en la membrana de las células.

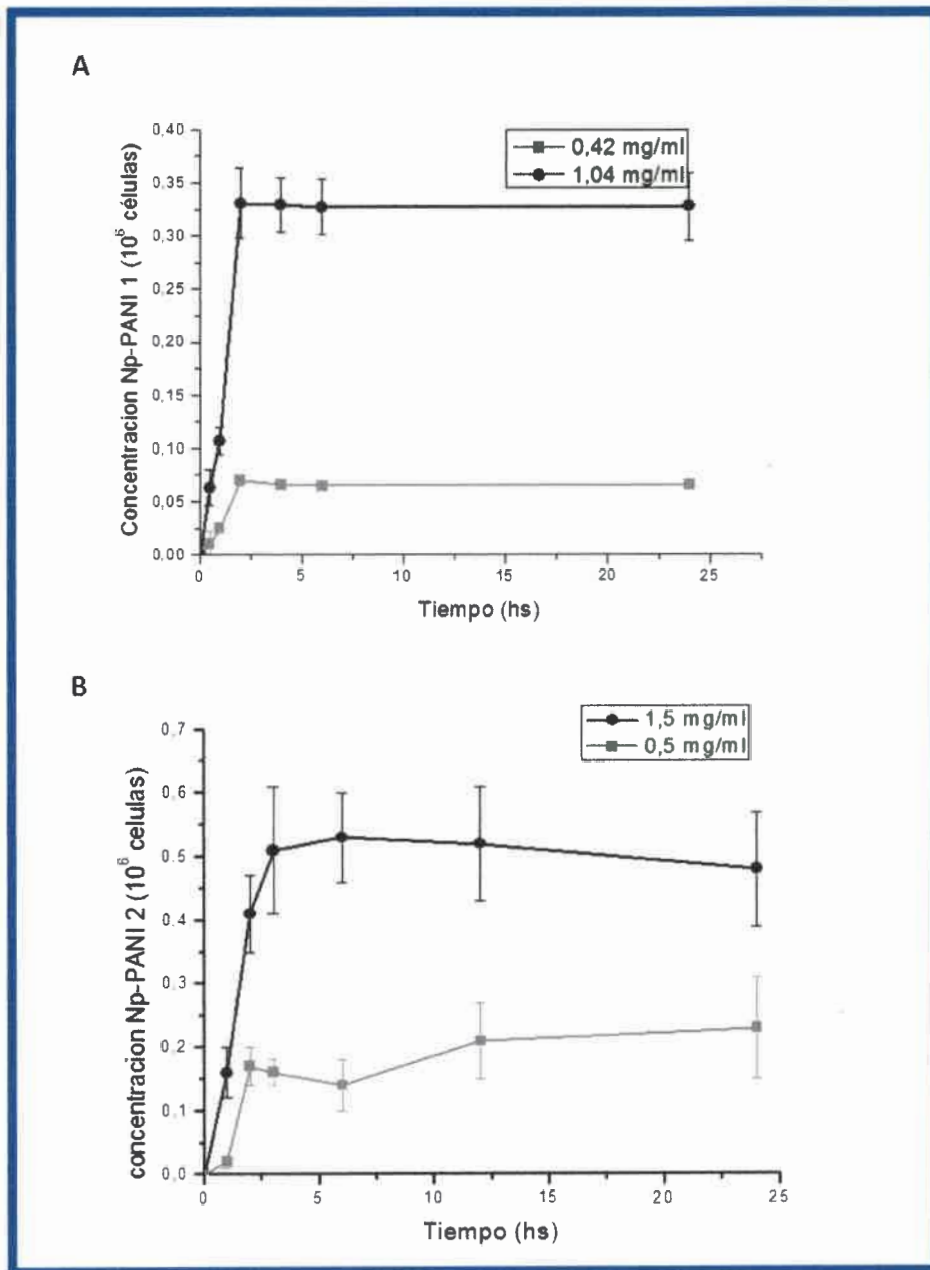


Figura 25: Cinética de incorporación de a) NP-PANI 1 y b) Np-PANI 2 en las células LM2 incubadas a distintas concentraciones durante diferentes tiempos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

La incorporación celular de las nanopartículas está determinada por varios factores, la mayoría provenientes de las propiedades fisicoquímicas de las mismas, incluyendo el tamaño, la forma, la carga, hidrofobicidad, el grado de aglomeración; entre otras<sup>21-25</sup>. Las diferencias encontradas en la incorporación entre ambas dispersiones de



Np-PANI, podrían atribuirse en gran parte al tamaño, debido a que Np-PANI2 (c.a. 90 nm) presenta menor tamaño que Np-PANI1 (c.a. 200 nm).

Por otro lado, para investigar el efecto del metabolismo celular en la captación de nanopartículas de PANI, las células se incubaron a 4° C antes y durante el tratamiento con nanopartículas (figura 26). Las células fueron tratadas con 1,04 mg/mL de Np-PANI 1 durante 0,5 y 1 hora, ya sea a 4° C o 37° C. La concentración intracelular de nanopartículas se determinó mediante espectroscopia UV-visible luego de estos tiempos. La incorporación a 37° C no varió con respecto al experimento anterior, pero si disminuyó significativamente en las células incubadas a 4° C (disminución del 60 % a 4° C en comparación con 37° C). Este resultado sugiere un mecanismo activo de incorporación celular de tipo endocítico. Debido a que la inhibición de la endocitosis dependiente de la temperatura de incubación no fue completa; probablemente algunas de las nanopartículas permanezcan unidas a la membrana celular. Casas y col. han observado que en explantos tumorales tratados con ALA liposomal, se pueden distinguir vesículas de fosfolípidos en el citoplasma y en el espacio intracelular a punto de ser incorporadas en las célula LM2. Este hallazgo sugiere que las células LM2 poseen una capacidad importante de incorporación por la vía endocítica y que los lisosomas serían el destino final luego de la incorporación de estos liposomas<sup>26</sup>.

Se ha sugerido al compartimento lisosomal como el sitio intracelular más probable de almacenamiento y degradación de los nanomateriales<sup>27</sup>. Los lisosomas presentan un pH ácido (4 - 5,5) y por esta razón, se propuso que esta condición acida favorece el cambio de transición del polímero polianilina, desde el estado básico de polianilina esmeraldina (EB) en la forma de sal de esmeraldina (ES) debido al incremento de la concentración de protones<sup>28</sup>. Lo cual tiene una fuerte influencia en la conductividad del polímero. La forma eléctricamente conductora del polímero es la ES, y la transición desde EB a ES se produce principalmente entre pH 3 y 6 y por lo tanto el pH lisosomal mejoraría la actividad fototérmica de las Np-PANI.

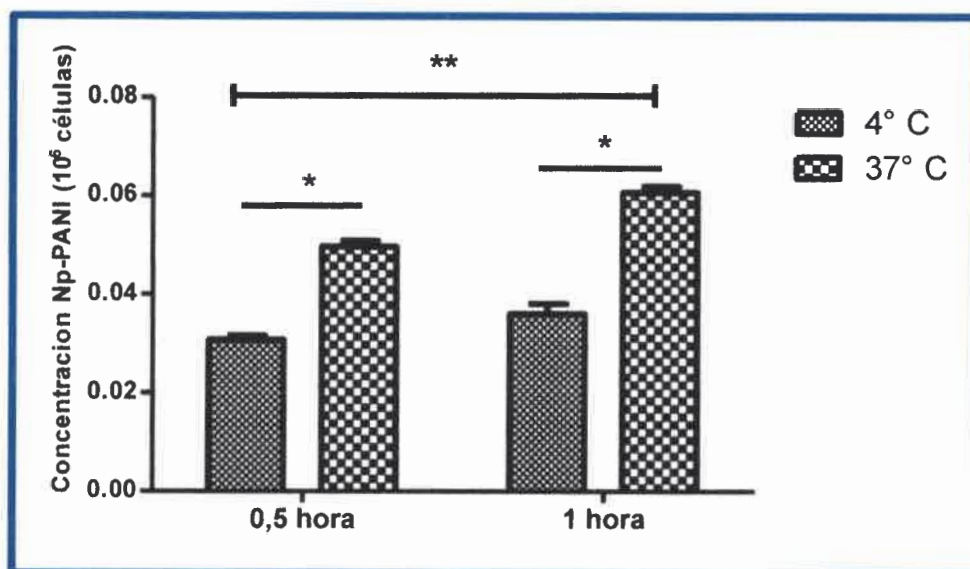


Figura 26: Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de internalización de Np-PANI 1 en células LM2. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \* y \*\*  $p < 0.05$ .

La mayoría de otras macromoléculas y ensamblajes moleculares en nanoescala se internalizan mediante endocitosis. Este destino endocítico de nanomateriales ha sido demostrado por varios precedentes en la literatura<sup>29</sup>. Los mismos están confinados en endolisosomas (vesículas de membrana) y son incapaces de alcanzar el citosol. Se ha demostrado que la forma y el tamaño de las nanopartículas puede afectar en gran medida los procesos de captación celular. Partículas esféricas de tamaño similar se incorporan más eficientemente que partículas con forma de varilla, lo que se explica por el mayor tiempo de envoltura requerido por la membrana para las partículas alargadas. La vía de endocitosis mediada por clatrina muestra un límite de tamaño superior para la internalización de aprox. 200 nm y parámetros cinéticos pueden determinar la internalización casi exclusivamente de tales partículas por esta vía en lugar de la vía mediada por caveolina. En consecuencia, estos datos sugieren que, de una manera dependiente del tamaño, existen diferencias en el mecanismo de control y de la potencial internalización con un punto de inflexión cada vez más evidente en un tamaño de aprox. 200 nm. La internalización preferencial de las partículas más grandes, puede entonces, estar relacionado con una dependencia más estricta de la vía mediada por clatrina en función del tamaño de las partículas con la consiguiente cinética rápida de internalización<sup>30</sup>.

### 8.2.3. Evaluación de la actividad fototérmica de Np-PANI en cultivos 2D

Para evaluar la capacidad de las Np-PANI de sensibilizar células tumorales expuestas a la irradiación, los cultivos celulares en monocapa fueron incubados durante 3 horas con Np-PANI 1 (1,04 mg/ml) y durante 3 y 24 horas con Np-PANI 2 (1,5 mg/ml) e irradiados con luz NIR continua, con una potencia de 500 mW/cm<sup>2</sup> durante 10 y 15 minutos. Posteriormente se evaluó la morfología celular y nuclear. En las células de los grupos tratados con Np-PANI 1 durante 3 horas e irradiados, se pudo observar una menor cantidad de células adheridas, como también un cambio en la morfología de las mismas, perdiendo la forma fibroblástica típica de esta línea celular y adquiriendo una forma más redondeada (figura 27). El área afectada corresponde al área de irradiación, es decir al área del spot del láser NIR (3 mm). Por lo tanto, esto indicaría la muerte de las células tumorales y el consiguiente desprendimiento de las mismas al sustrato.

Teniendo en cuenta que la concentración de 0,313 mg/ml provoca un incremento de 4° C luego de la iluminación NIR durante 15 minutos; es posible suponer que el cambio de temperatura (4° C) debería ser suficiente para desencadenar la muerte celular. Esta concentración intracelular se logró luego de la incubación con Np-PANI 1 (1,04 mg/ml) durante 3 horas. Por otra parte, cuando se evaluó la morfología nuclear, se pudo observar en las áreas de irradiación la presencia de núcleos con cromatina claramente fragmentada y formación de cuerpos apoptóticos en las células que permanecían adheridas al sustrato. Este evento se pudo visualizar en la periferia del spot del láser donde ocurriría una mayor disipación del calor (figura 28).

La fragmentación del ADN nuclear es un evento característico principalmente de la muerte celular por apoptosis<sup>31</sup>. Por lo tanto, la TFT con Np-PANI 1 podría estar desencadenando este tipo de muerte celular en la línea LM2 además de la muerte celular por necrosis. Un resultado similar fue obtenido empleando nanopartículas de PANI de menor tamaño (c.a. 48,5 nm) funcionalizadas con el polímero F127 que contiene cadenas de polioxietileno donde el efecto fototérmico se logró a las 4 horas de incubación con las nanopartículas obteniendo muerte celular por necrosis y apoptosis<sup>31</sup>.



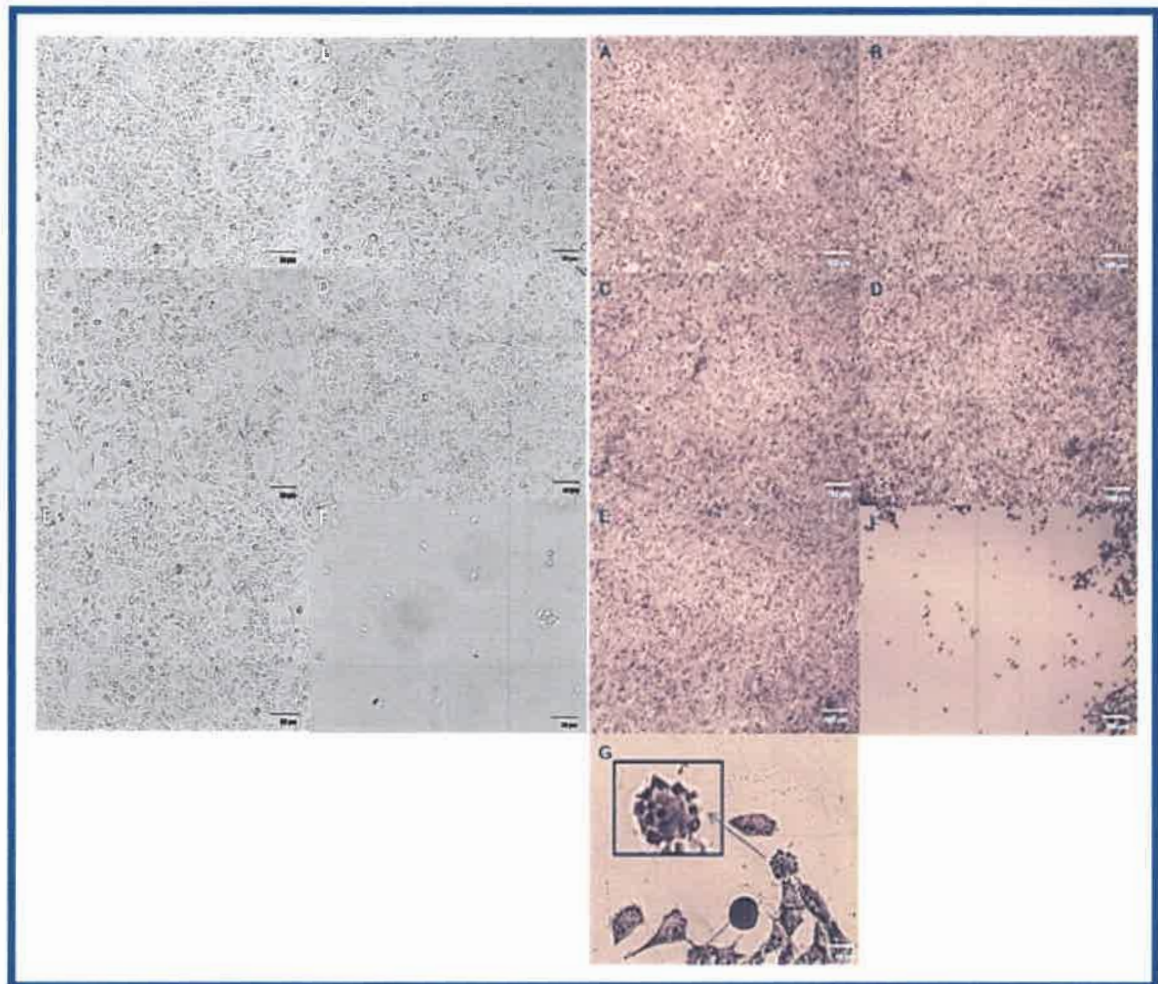


Figure 27: Efecto de la TTT con Np-PANI 1 sobre la morfología de células LM2 observadas mediante campo claro (panel izquierdo) y tinción con azul de Toluidina (panel derecho) (10X). (A) Células control, (B) células incubadas con 1,04 mg/ml de Np-PANI 1 en condiciones de oscuridad; (C) células iluminadas con láser NIR durante 15 min (control luz); (D) células incubadas con PVP 2% en PBS a la concentración utilizada en la estabilización de Np-PANI 1 en DMEM; (E) células incubadas con PVP 2% en DMEM e irradiadas con luz NIR 15 min y (F) células incubadas con 1,04 mg/ml de Np-PANI 1 e irradiadas con luz NIR durante 15 min. G- Magnificación (400X) de células tratadas con Np-PANI 1 e irradiadas, la flecha señala una célula con morfología apoptótica en la zona de iluminación con el spot del láser.



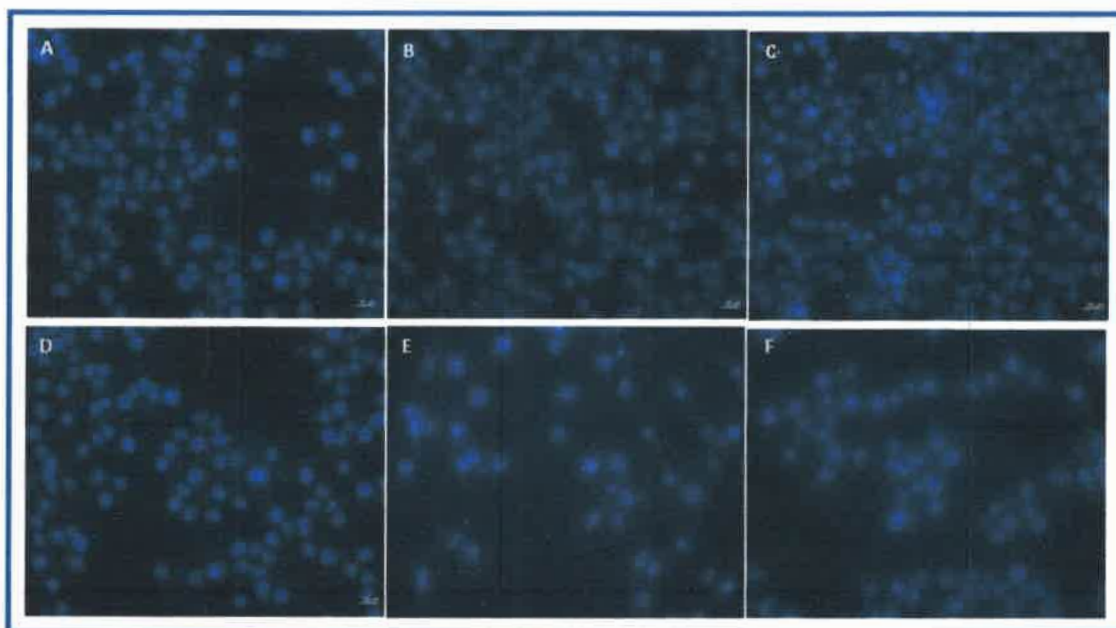


Figura 28: Efecto de la TFT con Np-PANI 1 sobre la morfología nuclear de células LM2 teñidas con el fluoróforo Hoechst. A- Control, B- Células tratadas con 1,04 mg/ml de Np-PANI 1 en oscuridad, C- Células tratadas con PVP, D y E- Células tratadas con 1,04 mg/ml de Np-PANI 1 e irradiadas con láser NIR durante 10 y 15 min (flechas amarillas señalan cuerpos apoptóticos y marginación periférica de la cromatina condensada).

Contrariamente, el efecto fototérmico de las Np-PANI 2 no fue tan marcado cuando las células fueron incubadas con concentraciones similares durante 3 horas y empleando la misma dosis de luz (figura 29). A pesar de que se alcanzaron mayores concentraciones intracelulares de Np-PANI 2 (experimento de incorporación celular) con respecto a Np-PANI 1. Se logró evidenciar muerte de las células tratadas con Np-PANI 2 luego de 24 horas de incubación con cambios morfológicos y nucleares evidentes (figura 29). Por lo tanto, las Np-PANI 1 resultarían ser más eficientes en lograr el efecto fototérmico con menores tiempos de incubación, que las Np-PANI 2.

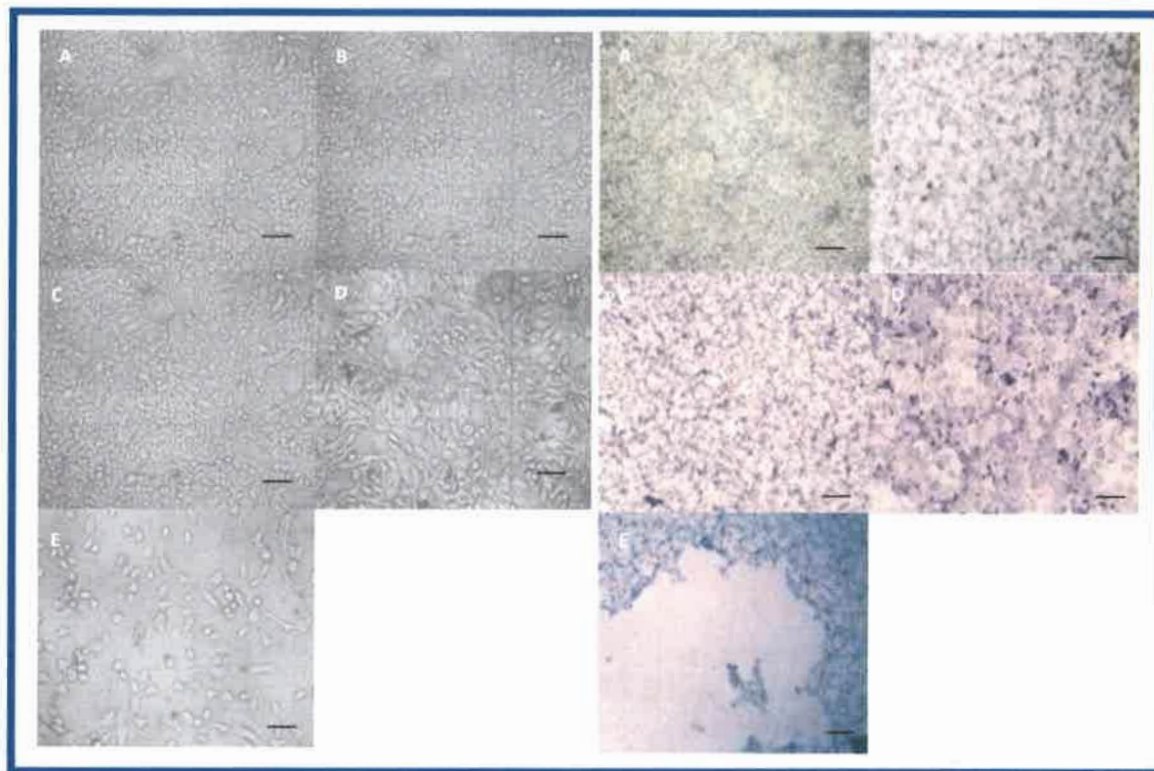


Figura 29: Efecto de la TTT con Np-PANI 2 sobre la morfología de células LM2 observadas mediante campo claro (panel izquierdo) y tinción con azul de Toluidina (panel derecho) (10X). A- Células iluminadas con láser NIR durante 15 min (control luz), B- células incubadas con PVP 1% + PNIPAM 1% en DMEM e irradiadas con luz NIR 15 min, C- células incubadas con 1,5 mg/ml de Np-PANI 2 en condiciones de oscuridad (control oscuridad), D- células incubadas 3 horas con 1,5 mg/ml de Np-PANI 2 e irradiadas con láser NIR 15 min, E- células incubadas 24 horas con 1,5 mg/ml de Np-PANI 2 e irradiadas con láser NIR durante 15 min.

#### 8.2.4. Evaluación de estrés oxidativo pre y post tratamiento fototérmico

La interacción de las nanopartículas con las células puede inducir estrés oxidativo, favoreciendo la producción celular de ROS en grandes cantidades. Una comprobación del estado del balance oxidativo intracelular se realizó utilizando el colorante fluorescente diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) (figura 30, 31 y 32). Las células irradiadas en presencia o ausencia del polímero dispersante no mostraron la generación de ROS. Las células tratadas sólo con nanopartículas de PANI en condiciones de oscuridad tampoco mostraron la generación de estrés oxidativo (figura 30a y 31a). Por el contrario, Xu et al., demostraron que la exposición a nanopartículas de cobre afecta el equilibrio antioxidante/ oxidante, resultando en la mayor generación de ROS con un aumento en la citotoxicidad en podocitos<sup>32</sup>. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en el mecanismo de toxicidad de estas nanopartículas. Un comportamiento similar se ha observado con distintas nanopartículas



en células cultivadas<sup>33-36</sup>. Sin embargo, este no parece ser el caso para las Np-PANI. En realidad, Kucekova y col. observaron que la exposición de neutrófilos a Np-PANI < 150 mg/ml no sólo no produce ROS intracelular, sino que además las partículas pueden actuar como eliminadores de ROS<sup>20</sup>. En nuestro estudio, se encontró que en las células tratadas con Np-PANI (0,42 y 1,04 mg/ml) e irradiadas con luz NIR se producen ROS, los cuales pudieron ser detectados a partir de la fluorescencia de DCF (figura 30b y 31b). Estos resultados indican que la oxidación intracelular se está produciendo durante la TFT.

Las mitocondrias son los sitios potenciales de la producción de ROS en una célula y por lo tanto uno de los sitios de generación de estrés oxidativo después de provocar daños en las organelas<sup>37,38</sup>. Recientemente, algunos estudios han informado que nanopartículas pueden localizarse cerca de las mitocondrias en las células tumorales y por lo tanto inducir daños estructurales importantes que causaría la generación de ROS después de la TFT<sup>39,40</sup>. Además, la exposición a alta temperatura durante un período de tiempo suficiente puede causar daño físico tales como la desnaturalización de proteínas y la lisis de la membrana con el consiguiente aumento del estrés oxidativo<sup>41,42</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, se sugiere que las mitocondrias podría ser un objetivo secundario de la TFT como otros orgánulos tales como lisosomas y por lo tanto los daños de estas estructuras pueden alterar el equilibrio oxidativo de las células. Las Np-PANI se liberarían en el citoplasma de las células luego de su incorporación por vías endocíticas y podrían translocar desde los endolisosomas a regiones cercanas a las mitocondrias. Debido a esto, se produciría la disminución de los potenciales de membrana mitocondrial, aumento del estrés de oxidación y finalmente la muerte celular. Basándose en estos hallazgos, se ha postulado que el daño y/o toxicidad celular asociada con la hipertermia está mediada en parte por un aumento del flujo de ROS. Estudios recientes confirman que algunos nanomateriales perturban la membrana lisosomal y por lo tanto que la activación de los lisosomas es capaz de aumentar el nivel de ROS<sup>27,43-45</sup>. El aumento de ROS intracelulares por hipertermia podría ser considerado un probable mecanismo de lesión celular en este tipo de terapia fotoasistida. En las células con daños por ablación térmica se desencadenaría una muerte celular por necrosis con el consiguiente desprendimiento del sustrato. Aquellas células donde el daño hipertérmico se consigue a menores temperaturas (41 – 45°C) serían susceptibles a un daño por estrés oxidativo que llevaría a la muerte celular por apoptosis.



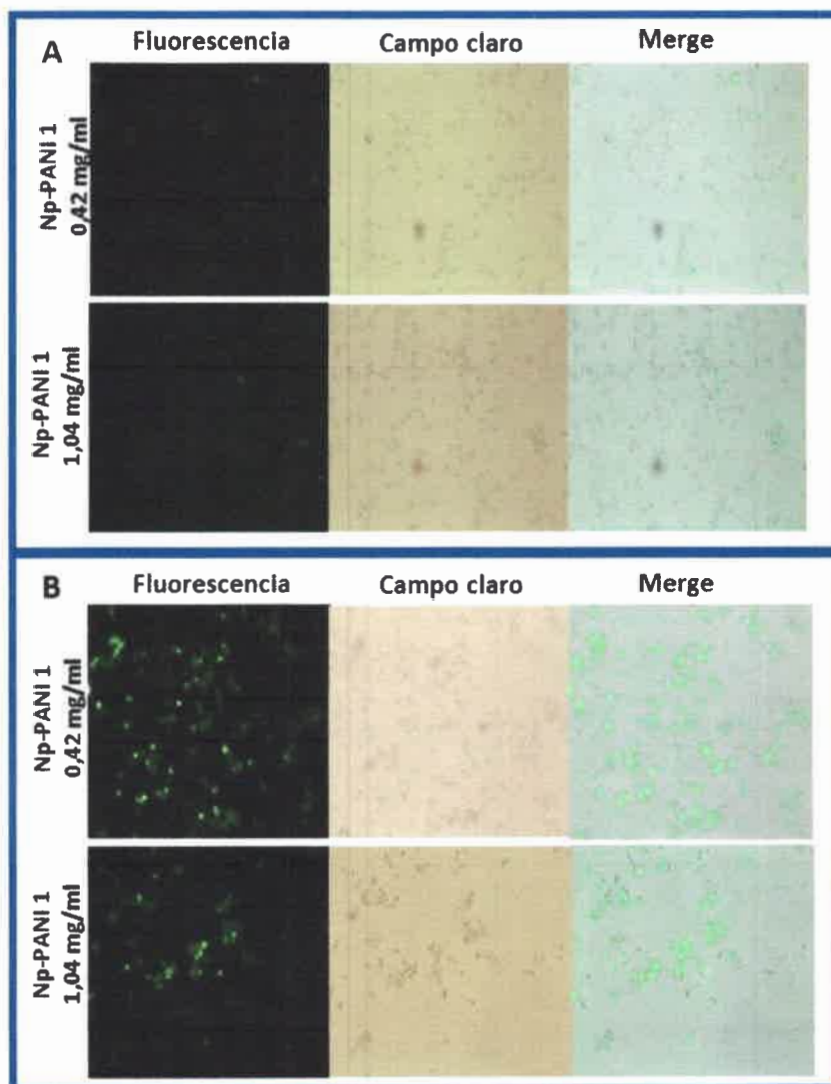


Figura 30: Células LM2 sometidas a la exposición de Np-PANI 1 y luego de la TFT incubadas con el fluoróforo DCFH-DA. a) Células expuestas a Np-PANI 1 por 24 horas en condiciones de oscuridad. b) Células expuestas a Np-PANI 1 e irradiadas con luz NIR.



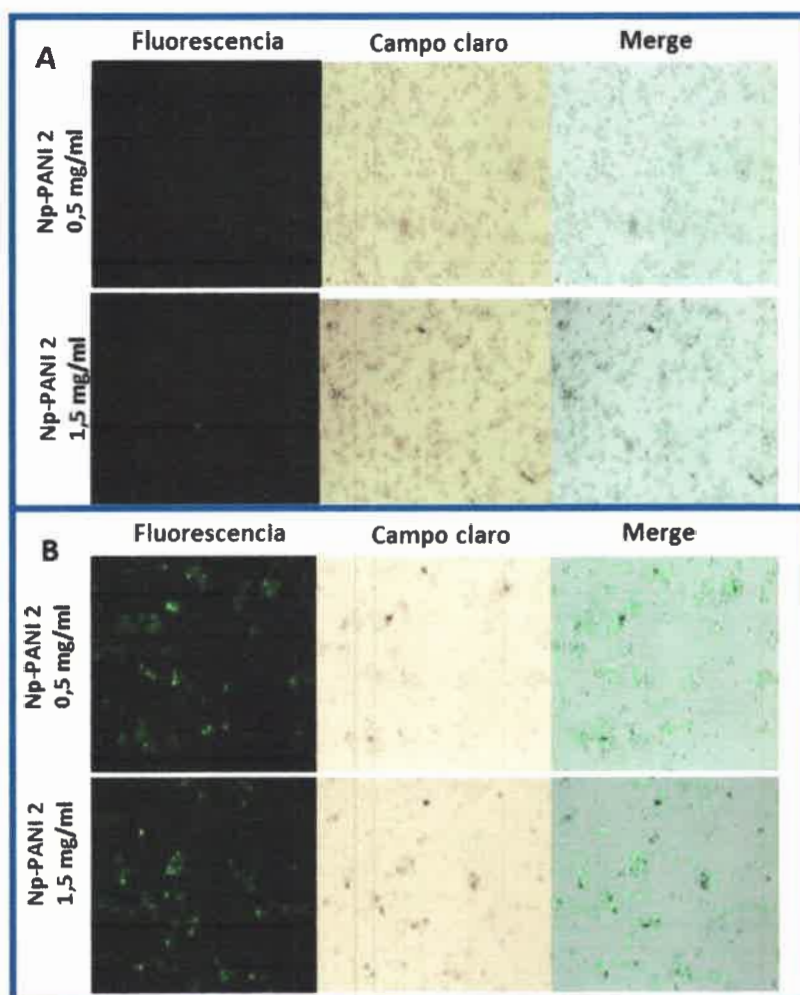


Figura 31: Células LM2 sometidas a la exposición de Np-PANI 2 y luego de la TFT incubadas con el fluoróforo DCFH-DA. a) Células expuestas a Np-PANI 2 por 24 horas en condiciones de oscuridad. b) Células expuestas a Np-PANI 2 e irradiadas con luz NIR.

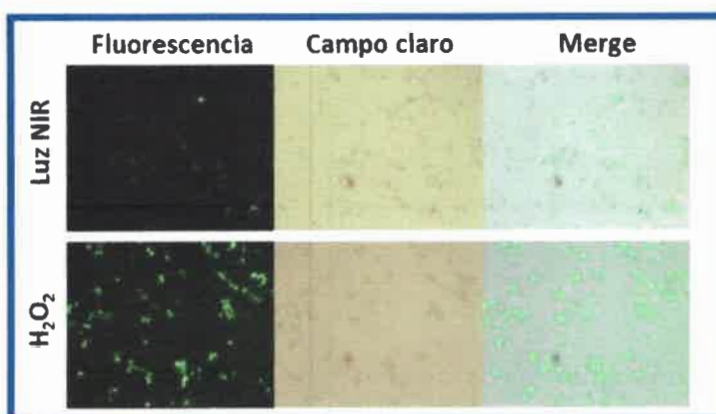


Figura 32: Células LM2 incubadas previamente con DCFH-DA y expuestas a una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M (control positivo) y tratadas con luz NIR durante 15 min (control luz y negativo). Observándose la fluorescencia de la sonda DCF solamente en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 8.2.5. Formación de esferoides con la línea celular LM2

Con el objetivo de establecer cultivos tridimensionales con la línea celular LM2, se empleó la técnica “hanging drop” o gota colgante debido a un mejor resultado en cuanto a homogeneidad de los esferoides. Para sembrar las gotas colgantes, se utilizaron dos densidades celulares: 10.000 células y 20.000 células por gota y a los 4 días, tiempo necesario para lograr la formación de aglomerados celulares, se recolectaron los esferoides. Los esferoides obtenidos de 10.000 células por gota resultaron ser más homogéneos (diámetro de 200  $\mu\text{m}$  aproximadamente) y más compactos que los obtenidos con 20.000 células por gota (figura 33).

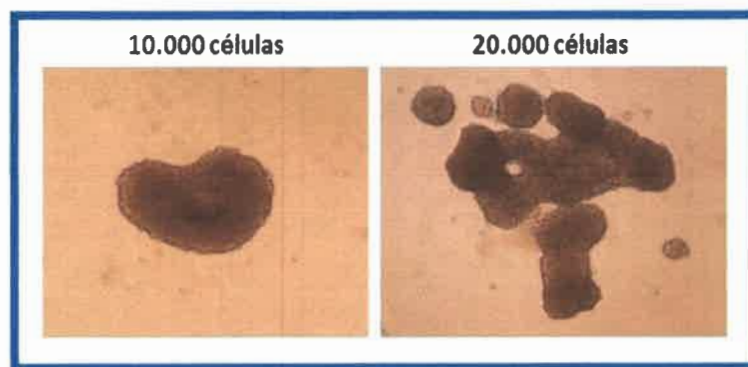


Figura 33: Esferoides generados con la línea celular LM2 mediante la técnica de gota colgante empleando dos densidades celulares.

### 8.2.6. Evaluación de la actividad fototérmica de Np-PANI en cultivos 3D

Como no se pudo cuantificar la viabilidad celular luego de la TFT en los cultivos de monocapas debido al sistema de iluminación láser utilizado, el cual solo permite la iluminación de una región de 2-3 mm de diámetro de las placas. Es que mediante la implementación de cultivos 3D que permiten concentrar el número de células en una estructura compacta y además representa en mayor medida la estructura tumoral, se pudieron realizar ensayos de fotoirradiación con nanopartículas y determinar la supervivencia celular luego del tratamiento.

Luego de incubar los esferoides individualmente por 3 y 24 horas con distintas concentraciones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2; se procedió a la iluminación con una dosis de luz equivalente a la utilizada en los experimentos en cultivos 2D. Por un lado, se evaluó la morfología e integridad de los esferoides 24 horas post-TFT. Se pudo observar una pérdida de la morfología compacta de los esferoides tratados con una concentración de

4,16 mg/ml de Np-PANI 1 e irradiados con presencia de detritus celular (figura 34c). Estos cambios no se observaron en concentraciones menores de Np-PANI 1 ni tampoco en ninguna de las concentraciones de Np-PANI 2 ensayadas tanto en tiempos de incubaciones cortos (3 horas) ni de 24 horas (figura 34b). Los demás grupos que incluían: un grupo sin ningún tipo de tratamiento, un grupo de esferoides solamente irradiados con luz NIR, grupos de esferoides incubados con los dispersantes de las nanopartículas y sometidos a irradiación y esferoides incubados con ambas dispersiones de nanopartículas en condiciones de oscuridad, tampoco mostraron cambios morfológicos (figura 34a).

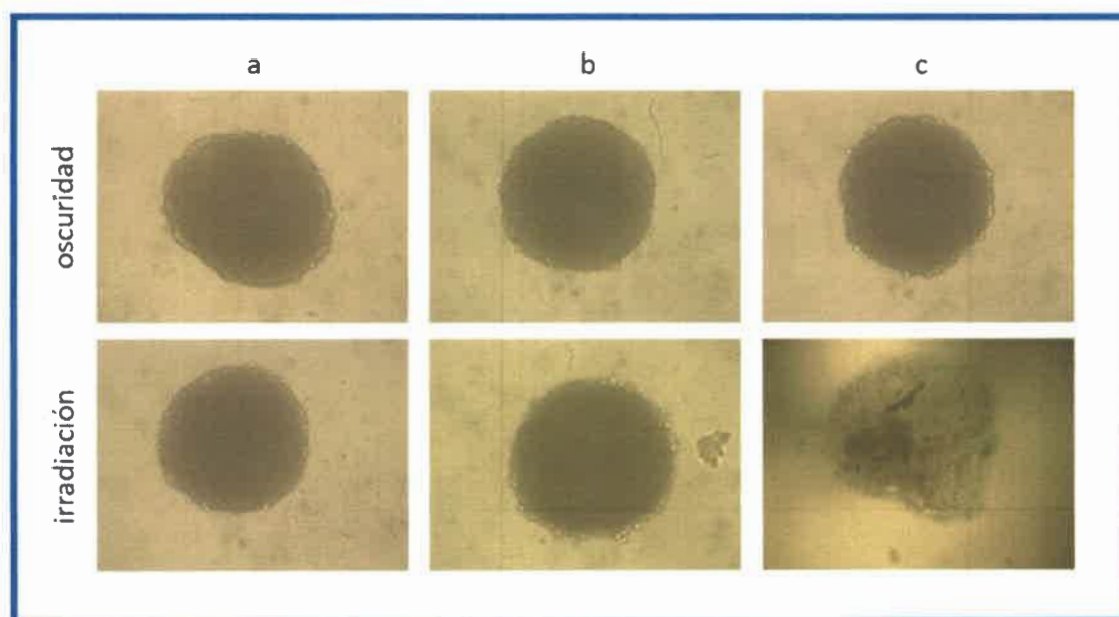


Figura 34: Esferoides 24 horas post TFT (10x). a) Esferoides controles, b) esferoides tratados con Np-PANI 2 (4,5 mg/ml) y c) esferoides tratados con Np-PANI 1 (4,16 mg/ml). El tiempo de incubación corresponde a 24 horas y la dosis de luz utilizada corresponde a  $500 \text{ mW/cm}^2$  durante 15 min. Los grupos correspondientes a los dispersantes de las nanopartículas tanto en condiciones de oscuridad como luego de la irradiación no difirieron de los grupos controles.

Con el fin de determinar la viabilidad celular post TFT de los esferoides luego de aplicado el tratamiento fototérmico; se procedió a realizar un ensayo colorimétrico de viabilidad celular. La viabilidad celular determinada mediante el ensayo de fosfatasa acida, 24 horas post TFT, no difirió estadísticamente entre los grupos de esferoides controles mostrando porcentajes de viabilidades superiores al 90% (figura 35 y 36). Sin embargo, se pudo determinar una disminución significativa de la viabilidad celular en los esferoides tratados con Np-PANI 1 a la concentración de 4,16 mg/ml, un tiempo de incubación de 24 horas y 15 min de irradiación NIR. Esta disminución fue del  $58 \pm 6 \%$  (figura 35) y se correspondió con los cambios observados en cuanto a la pérdida de la

integridad de los esferoides visualizados por microscopía óptica. Por el contrario, con las distintas concentraciones de Np-PANI 2 a la misma dosis de luz, no se observó una disminución de la viabilidad celular; lo que coincide con los nulos cambios morfológicos observados en los esferoides post TFT (figura 36).

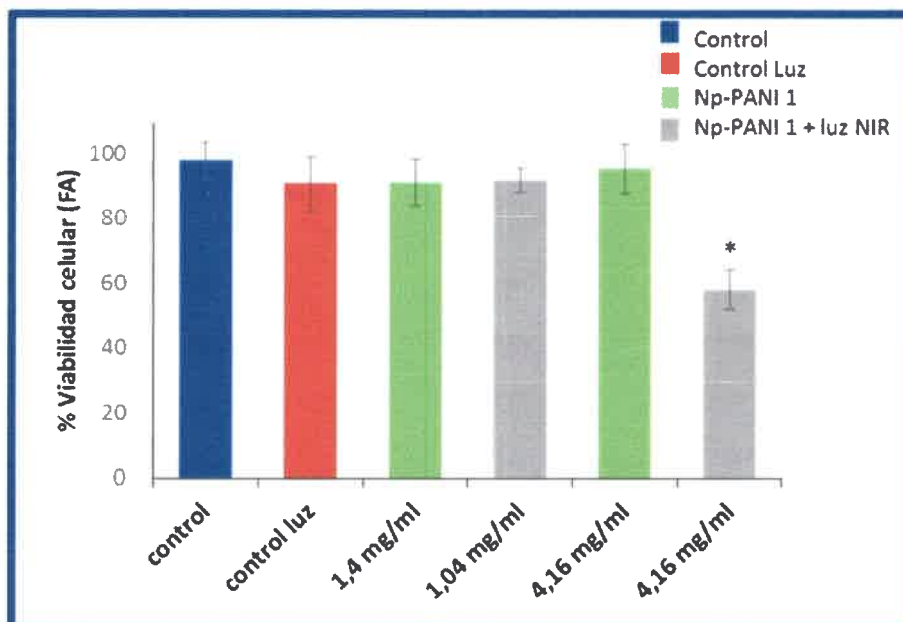


Figura 35: Efecto de NP-PANI 1 en condiciones de oscuridad y luego de la iluminación con láser NIR 15 sobre la viabilidad celular en esferoides de LM2. Los valores representan la media respecto a controles  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$

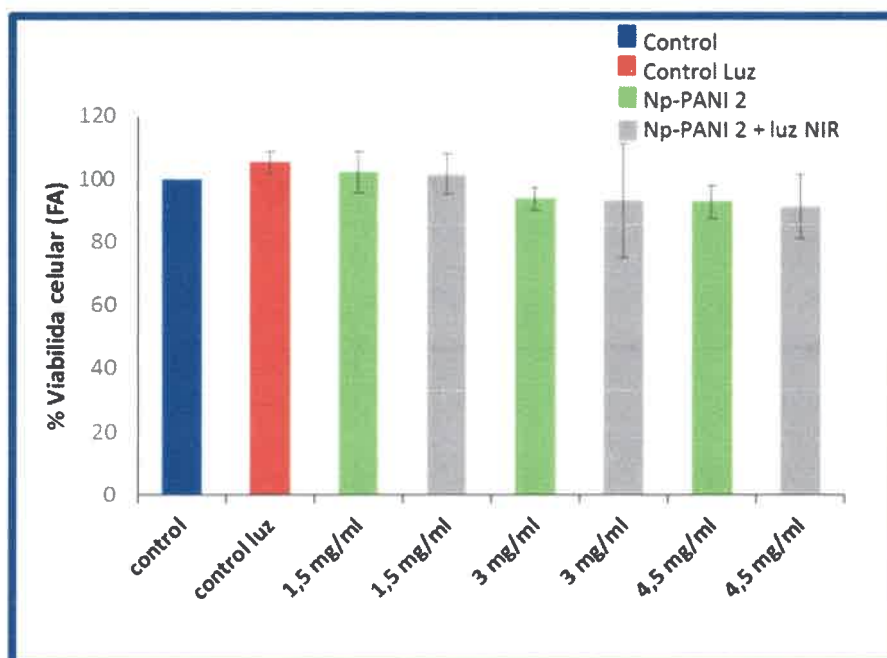


Figura 36: Efecto de NP-PANI 2 en condiciones de oscuridad y luego de la iluminación con láser NIR 15 sobre la viabilidad celular en esferoides de LM2. Los valores representan la media respecto a controles  $\pm$  error estándar.



Nuevamente se pudo determinar una mayor eficacia de las Np-PANI 1 en comparación con las Np-PANI 2 en provocar la muerte celular post TFT, en iguales condiciones de incubación y dosis de luz. Se considera que, los ensayos en modelos de cultivo 3D son de una complejidad intermedia entre los ensayos en cultivos en monocapa y en modelos *in vivo*. Estos modelos intermedios reflejan aspectos particulares de la arquitectura tumoral como de las interacciones celulares, e incluso pueden ser preferibles para determinados estudios de los procesos de carcinogénesis o para imitar las condiciones donde se estudian la arquitectura, función y la transformación neoplásica de diversos tipos tumorales<sup>46,47</sup>. De acuerdo a otros estudios, se espera que muchos tratamientos pierdan eficacia en el medio ambiente fisiopatológico 3D, y por lo tanto, se cree que la utilización, con mayor frecuencia de estos modelos en los ensayos para evaluar drogas antineoplásicas, puedan ser una herramienta para la selección negativa y de esta manera reducir los ensayos con animales<sup>48-51</sup>.

### 8.3. Experimentos *in vivo* en *Rhinella arenarum*

Varios modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* se han empleado para analizar las interacciones con nanomateriales y sus efectos tóxicos con sistemas biológicos. El creciente número de estudios citotóxicos de nanoestructuras de polianilina reflejan la importancia de información toxicológica sobre este tipo de materiales. Sin embargo, hasta el momento sólo se emplearon pruebas *in vitro* de biocompatibilidad para evaluarlos<sup>20,52,53</sup>. En concordancia, los estudios de citotoxicidad son esenciales para el empleo de nuevos materiales en aplicaciones biomédicas, ya que tanto la síntesis de las nanopartículas y su aplicación médica probablemente impliquen la liberación de nanopartículas al medio ambiente. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de información sobre sus posibles efectos de las nanopartículas en la salud y el medio ambiente.

Los estudios que utilizan sistemas *in vivo* tienen una mayor credibilidad, abordan el efecto global sobre la fisiología y la anatomía del organismo, y por lo tanto constituyen una plataforma más relevante para los estudios clínicos traslacionales posteriores. La utilización masiva de modelos con animales (roedores) suele ser costosa y conlleva una mano de obra intensiva y por lo general, han generado resistencia en la investigación biológica desde la visión de la anti-vivisección. Estas razones sumadas a los principios del trabajo ético que consideran las 3Rs (Replacement, Refinement, Reduction) para la

realización de experimentos científicos toxicológicos con animales, han hecho que se tomen en consideración otros modelos donde se empleen organismos no mamíferos. A nuestro entender, *Rhinella arenarum* no se ha utilizado hasta el momento para caracterizar los efectos tóxicos de nanomateriales en el medio acuático. Este organismo está ampliamente distribuido en nuestra región (Río Cuarto, provincia de Córdoba, Argentina). Por lo tanto, es fácil su obtención para realizar las pruebas sin afectar la biodiversidad de la especie.

### 8.3.1. Test agudo de letalidad en larvas de *R. arenarum* tras la exposición a Np-PANI

Se evaluó la susceptibilidad de larvas del estadio S.25 de *R. arenarum* mediante la exposición a diferentes concentraciones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 durante 96 horas. Este es un test estandarizado que emplea larvas de anfibios para evaluar toxicidad aguda de xenobióticos y podría ser una importante herramienta al momento de evaluar la toxicidad *in vivo* de nanomateriales. Los resultados se muestran en la figura 37 y 38.

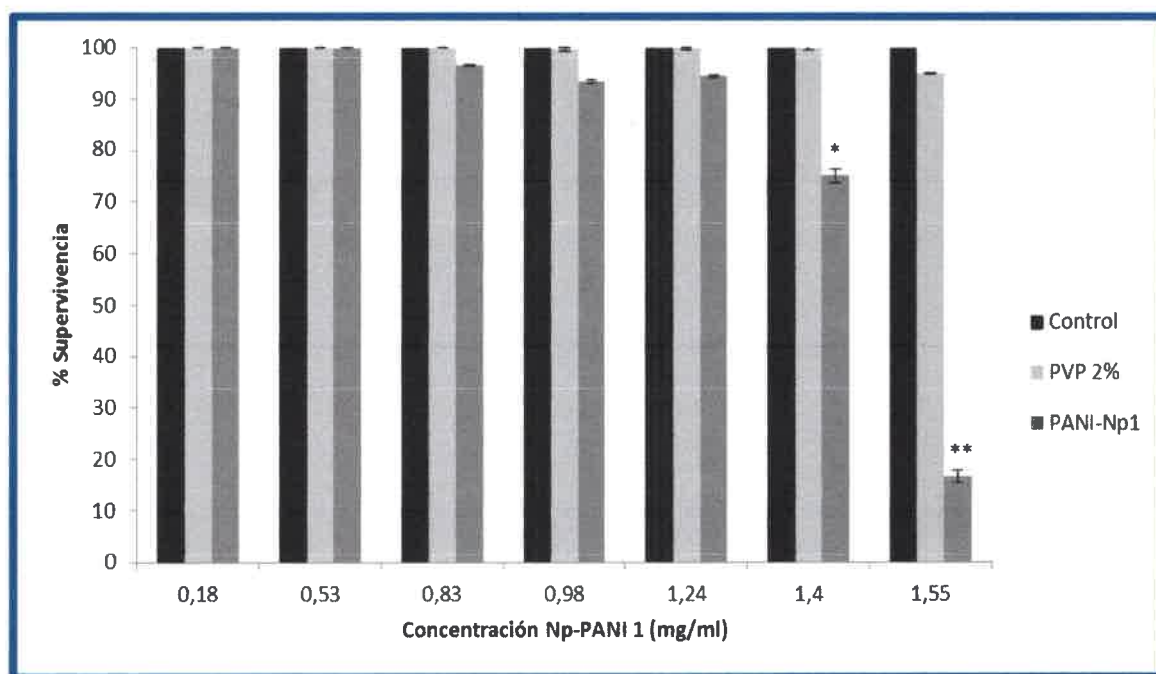


Figura 37: Test de toxicidad aguda en larvas S.25 incubadas a diferentes concentraciones de Np-PANI 1. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$ .

La supervivencia de las larvas no se vio afectada por la exposición a Np-PANI 1 en concentraciones de 0,18 hasta 1,24 mg/ml (figura 37). Los resultados muestran que, no existen diferencias estadísticas significativas en cuanto al porcentaje de supervivencia con respecto al control. Mientras que a partir de la concentración de 1,4 mg/ml se pudo

observar una disminución estadísticamente significativa en la supervivencia alcanzando un valor de  $70 \pm 0,1$ . De acuerdo a estos resultados a una concentración mayor de Np-PANI 1, se pudo observar que el porcentaje de larvas vivas disminuyó a  $16,7 \pm 1,2$ . De ese modo se puede concluir que existe una disminución en cuanto a la supervivencia de las larvas dependiente de la concentración. Además, se pudo comprobar la inocuidad de PVP, polímero utilizado como dispersante en la síntesis de las Np-PANI en las distintas concentraciones utilizadas para estabilizar las nanopartículas (figura 37).

Estos resultados indicarían que existe una tolerancia de las larvas S.25 a la exposición de Np-PANI 1 en concentraciones menores de 1,4 mg/ml. A mayores concentraciones las nanopartículas afectarían el desarrollo y la viabilidad de las larvas. Además el efecto tóxico sería dosis dependiente.

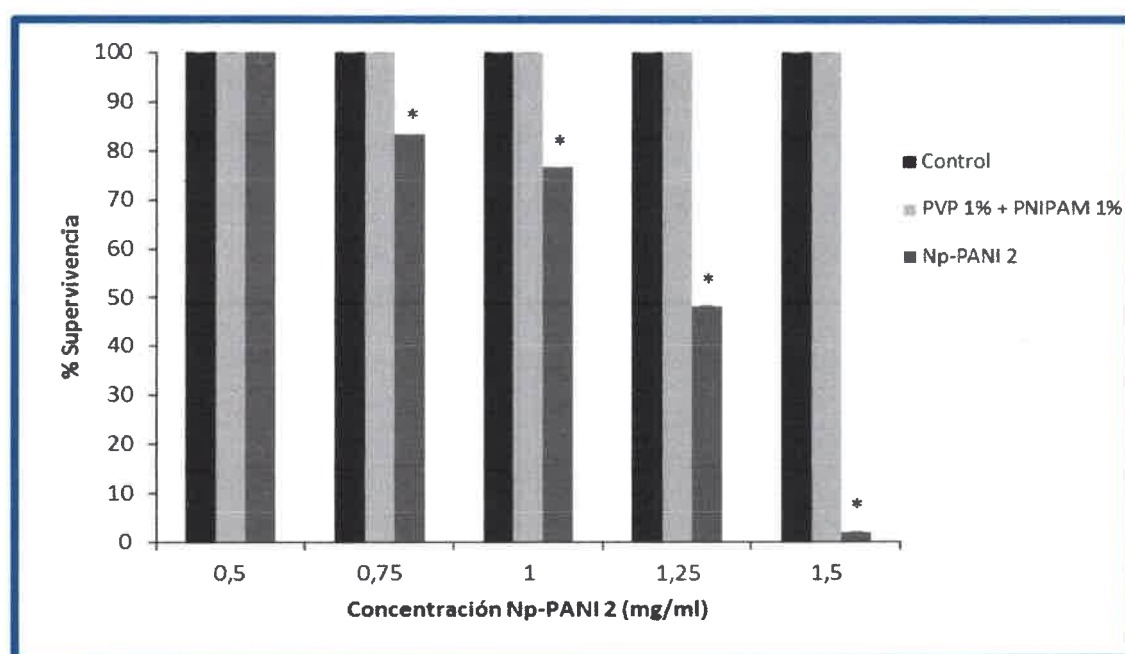


Figura 38: Test de toxicidad aguda en larvas S.25 incubadas a diferentes concentraciones de Np-PANI 2. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0,05$

Por otra parte, cuando se evaluó la toxicidad de Np-PANI 2 encontramos diferencias significativas con respecto a las Np-PANI 1. Se pudo determinar que los efectos letales se presentaron a una concentración menor que en las Np-PANI 1 (0,75 mg/ml). Por otra parte, se comprobó la inocuidad de la combinación de los polímeros utilizados como dispersantes en la síntesis de las Np-PANI 2 (figura 38). Mediante el análisis estadístico se estimaron las NOEC,  $CL_{50}$  y  $CL_{99}$  para ambas Np-PANI. Tanto la  $CL_{50}$  como la NOEC resultaron inferiores para las Np-PANI 2 que las obtenidas para Np-PANI 1 (tabla 2). Estos resultados proporcionan información adicional sobre las

concentraciones a las cuales las Np-PANI resultarían ser tóxicas y letales en organismos vivos. La mayor toxicidad de las Np-PANI 2 podría atribuirse al menor tamaño que presentan las nanopartículas y por lo tanto a una mayor acumulación en los estadios larvales de *R. arenarum*.

Teniendo en cuenta la  $CL_{50}$  de ambas Np-PANI (tabla 2), podemos considerar a estas nanopartículas de polianilina como no tóxicas para los organismos acuáticos. Esto de acuerdo con la grilla descrita y aplicada por Sanderson y col. y Blaise y col. utilizada para la evaluación ecotoxicológica de la toxicidad de diversos nanomateriales<sup>54,55</sup>. Esta clasificación se basa en el valor de  $CL_{50}$  obtenido luego de la exposición a diferentes nanomateriales empleando los organismos acuáticos.  $CL_{50} < 0,1$  mg/L = corresponden a nanomateriales **extremadamente tóxicos** para los organismos acuáticos; valores de  $CL_{50}$  entre 0,1-1 mg/L = nanomateriales **muy tóxicos** para los organismos acuáticos; entre 1-10 mg/L = **tóxicos** para los organismos acuáticos; entre 10-100mg/L = **nocivo** para los organismos acuáticos y  $>$  a 100 mg/L = **no tóxico** para los organismos acuáticos. Por ejemplo, Salvaterra y col.<sup>56</sup> evaluaron el efecto letal de una exposición a nanopartículas de silicato de titanio (Np-TiSiO<sub>4</sub>) en larvas de *Pelophylax perezii*. Los efectos letales se observaron a partir de una concentración de 20 mg/L y por lo tanto, se consideraron nocivos a estos nanomateriales (Np-TiSiO<sub>4</sub>) para los organismos acuáticos de acuerdo a la grilla previamente mencionada<sup>57</sup>.

Tabla 2: Análisis Probit de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en larvas S.25 de *R. arenarum*. NOEC: concentración no letal;  $CL_{50}$ : Concentración que induce la muerte del 50% de las larvas tratadas y  $CL_{99}$ : concentración que induce la muerte del 99% de las larvas tratadas.

PROBIT	Np-PANI 1	Np-PANI 2
NOEC (letal)	0,94 mg/ml	0,5 mg/ml
$CL_{50}$	1,5 mg/ml	1,17 mg/ml
$CL_{99}$	2,4 mg/ml	2,77 mg/ml

Diversos estudios han concluido que una disminución del tamaño de nanopartículas puede conducir a un aumento de la toxicidad debido a la mayor área de superficie específica de las mismas<sup>35,58,59</sup>. Nuestros resultados están en concordancia con esto debido a la mayor toxicidad por parte de las Np-PANI 2, las cuales poseen un menor tamaño. Además hemos podido determinar una mayor toxicidad dependiente de la forma



del nanomaterial. Nanopartículas esféricas resultan más tóxicas que otras formas del mismo material. Comparando con un estudio previo utilizando otro nanomaterial de PANI (nanofibras), tanto las Np-PANI 1 como las Np-PANI 2 resultaron ser 6,56 y 3,94 veces más tóxicas, respectivamente, que nanofibras de PANI en larvas S.25 de *Rhinella arenarum*<sup>60</sup>. Estas conclusiones se basaron teniendo en cuenta los datos de concentraciones NOEC de los nanomateriales.

### 8.3.2. Test de teratogénesis en embriones de *R. arenarum*

Con el objetivo de evaluar los efectos teratogénicos de las nanopartículas se realizó el ensayo teratogénico en embriones de *R. arenarum* a partir de estadios blastoméricos S.2 – S.4. Este ensayo se llevó a cabo mediante la observación de los efectos embriotóxicos que surgieron de la exposición continua en embriones en la etapa de desarrollo de blástula temprana (S.2-S.4) en adelante, durante un período de 96 h. Los parámetros teratogénicos observados diariamente tuvieron que ver con el grado y tipos de malformaciones y la mortalidad de los embriones expuestos. Los efectos considerados subletales se expresaron como anomalías morfológicas, que implican teratogénesis y reducción del tamaño corporal.

Los estudios en embriones de *R. arenarum* mostraron efectos teratogénicos en los grupos tratados con ambos tipos de Np-PANI y también en aquellos incubados con el dispersante PVP, no así en los controles incubados con Ringer (figura 39 y 40). En cuanto a las Np-PANI 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los efectos subletales entre las diferentes concentraciones de Np-PANI 1 y las concentraciones del polímero PVP 2% en PBS. El efecto teratogénico de ambos tratamientos se observó a partir de la concentración de 0,18 mg/ml, y fue incrementándose a medida que las concentraciones eran mayores (figura 39). Estos resultados sugieren que el efecto subletal atribuible a estas nanopartículas podría deberse al polímero estabilizante. Kato y Nagao (2009) han reportado que de un efecto tóxico en embriones bovinos con supresión del desarrollo embrionario por parte del polímero PVP dependiendo de la concentración utilizada<sup>61</sup>. Mediante el análisis Probit se pudo estimar los valores de NOEC, CT<sub>50</sub> y CT<sub>99</sub> para los embriones tratados (tabla 3). Para éstas Np-PANI 1, se calculó un IT<sub>50</sub> de 5. Además, para ésta dispersión de nanopartículas, se observó un efecto letal en las etapas embrionarias, es decir que muchas malformaciones culminaban con la muerte de los embriones. El efecto letal de PANI-Np1 en los embriones expuestos

aumentó gradualmente a medida que las concentraciones aumentaron al igual que para PVP en todas las concentraciones testeadas (figura 41).

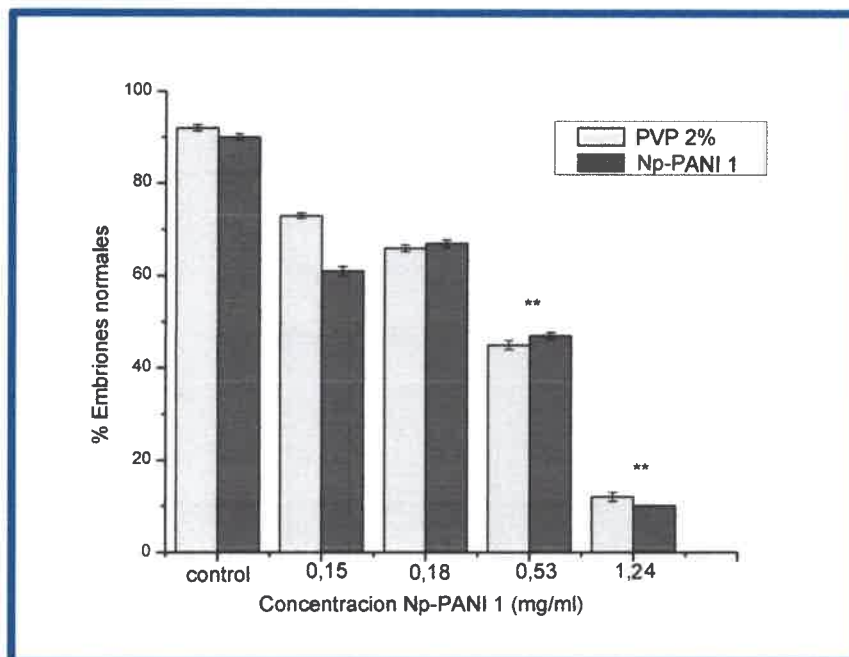


Figura 39: Porcentaje de embriones normales luego de la exposición por 96 horas a distintas concentraciones de PVP 2% en PBS y Np-PANI 1. \*\*  $p < 0.05$ .

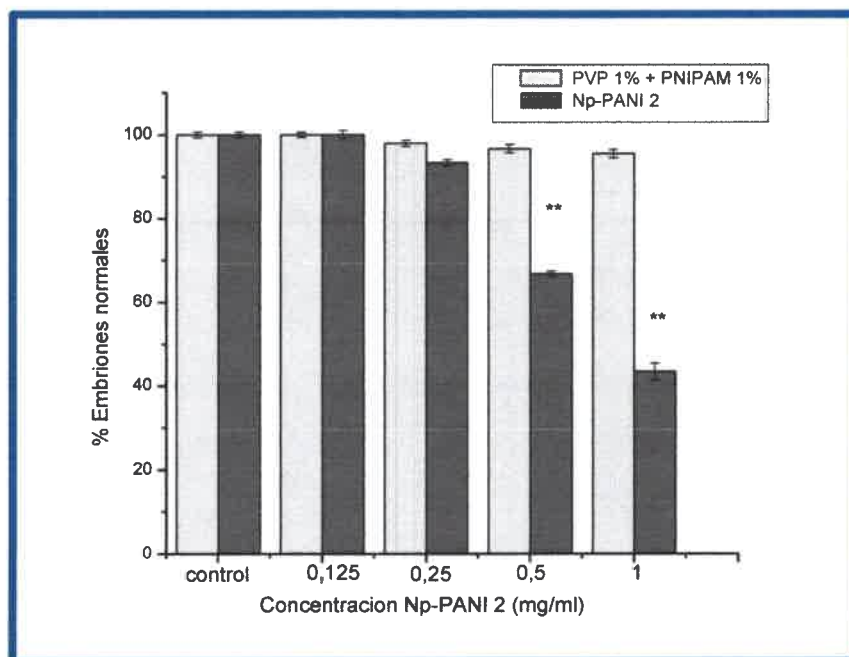


Figura 40: Porcentaje de embriones normales luego de la exposición por 96 horas a distintas concentraciones de PVP + PNIPAM 1% en PBS y Np-PANI 2. \*\*  $p < 0.05$ .

Tabla 3: Análisis Probit de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en embriones del estadio S.2 - S.4 de *R. arenarum*. NOEC: concentración no teratogénica; CT<sub>50</sub>: concentración que induce teratogénesis en el 50% de los embriones tratados y CT<sub>99</sub>: concentración que induce teratogénesis en el 99% de los embriones tratados.

PROBIT	PVP 2%	Np-PANI 1	Np-PANI 2
NOEC (subletal)	0,05 mg/ml	0,023 mg/ml	0,14 mg/ml
CT <sub>50</sub>	0,43 mg/ml	0,3 mg/ml	0,87 mg/ml
CT <sub>99</sub>	4,07 mg/ml	3,33 mg/ml	5,28 mg/ml

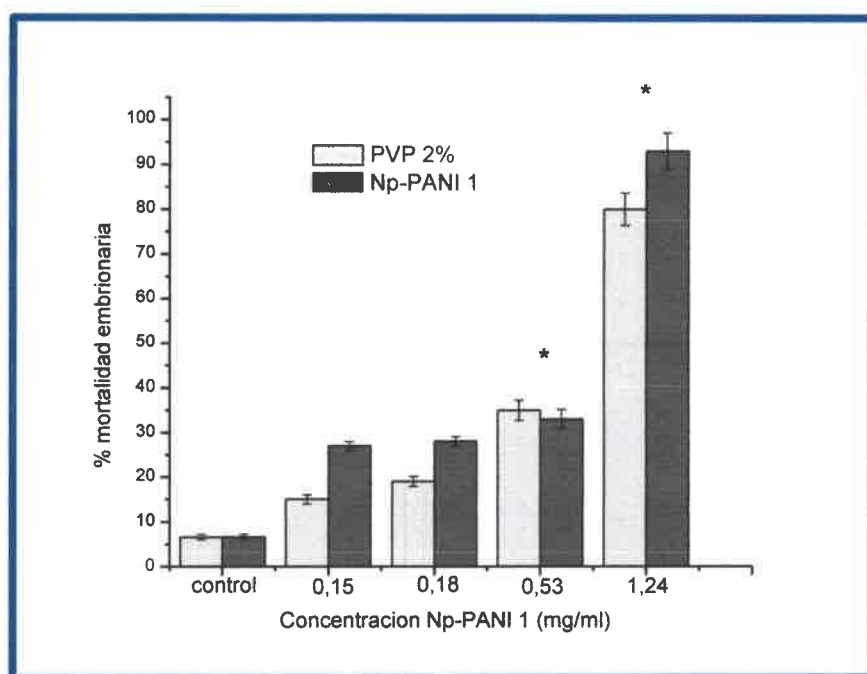


Figura 41: Porcentaje de mortalidad en embriones expuestos a Np-PANI 1 y PVP 2% en PBS. \*  $p < 0,05$ .

Por otro lado, respecto a las Np-PANI 2, la combinación de los dos polímeros estabilizantes (PVP 1% + PNIPAM 1%) no produjo efectos subletales en ninguna de las concentraciones testeadas. La exposición a Np-PANI 2 desencadenó un efecto subletal (malformaciones) a una concentración de 0,5 mg/ml (figura 40). Todas las concentraciones estimadas por el análisis Probit para Np-PANI 2 resultaron más elevadas que las estimadas para Np-PANI 1 (Tabla 3). Cuando los embriones en etapa S.2 - S.4 se incubaron a diferentes concentraciones de Np-PANI 1 y Np-PANI 2, se observaron efectos subletales dependiente de la concentración; aunque los efectos subletales de la exposición a las Np-PANI 2 fueron menos severos que los provocados por Np-PANI 1

indicando que la combinación de los polímeros estabilizantes reducen la toxicidad de las Np-PANI 2. Cabe aclarar que la combinación de dispersantes por sí misma, no produjo efectos teratogénicos y por lo tanto no se pudieron calcular las dosis teratogénicas de estas soluciones.

El  $IT_{50}$  calculado para estas Np-PANI 2 fue de 1,35. El IT es una medida del riesgo de producir efectos subletales de un determinado xenobiótico en el desarrollo temprano de una especie; si es mayor que 1,5 significa una mayor potencialidad de las nanopartículas para generar malformaciones en los embriones sin necesidad de inducir una mortalidad significativa<sup>62</sup>. El IT para Np-PANI 2 fue 1,35 mientras que para Np-PANI 1 fue 5,01, lo que indicaría un mayor potencial para inducir malformaciones por parte de las Np-PANI 1 con respecto a las Np-PANI 2. Cabe señalar que mientras que el IT disminuyó para las Np-PANI 2 a un valor significativo menor ( $TI = 1,35$ ), el efecto teratogénico permanece y es debido a la exposición a las nanopartículas.

Para evaluar el desarrollo de los embriones y determinar las malformaciones presentes en los distintos grupos de tratamientos (control Ringer y PBS, PVP 2% en PBS, PVP 1% + PNIPAM 1% en PBS; Np-PANI 1 y Np-PANI 2); se examinaron bajo la lupa los embriones en diferentes estadios: blástula temprana (S.2 - S.4), gástrula (S.10 - S.12), rotación (S.15) y se registraron los cambios morfológicos (figura 42). En cuanto al tipo de malformaciones observadas con las Np-PANI 1 pudimos determinar un patrón similar de malformaciones entre el grupo tratado con Np-PANI 1 y el tratado con el polímero estabilizante (PVP 2 % en PBS). Las anormalidades de desarrollo más comunes que se encontraron en embriones tratados con PVP fueron: eje anormal (figura 42c) y edema (figura 42d). En los embriones tratados con el Np-PANI 1 se observó predominio de crecimiento detenido en estadio S.12 coincidente con la etapa de gástrula tardía, (figura 42g), subdesarrollo en S.15 (figura 42e) y, en menor medida, el edema (figura 42f). Por el contrario, en los embriones de los grupos control (Ringer y PBS) no se observaron malformación que superen los valores normales de hasta un 10% (figura 42a y b).



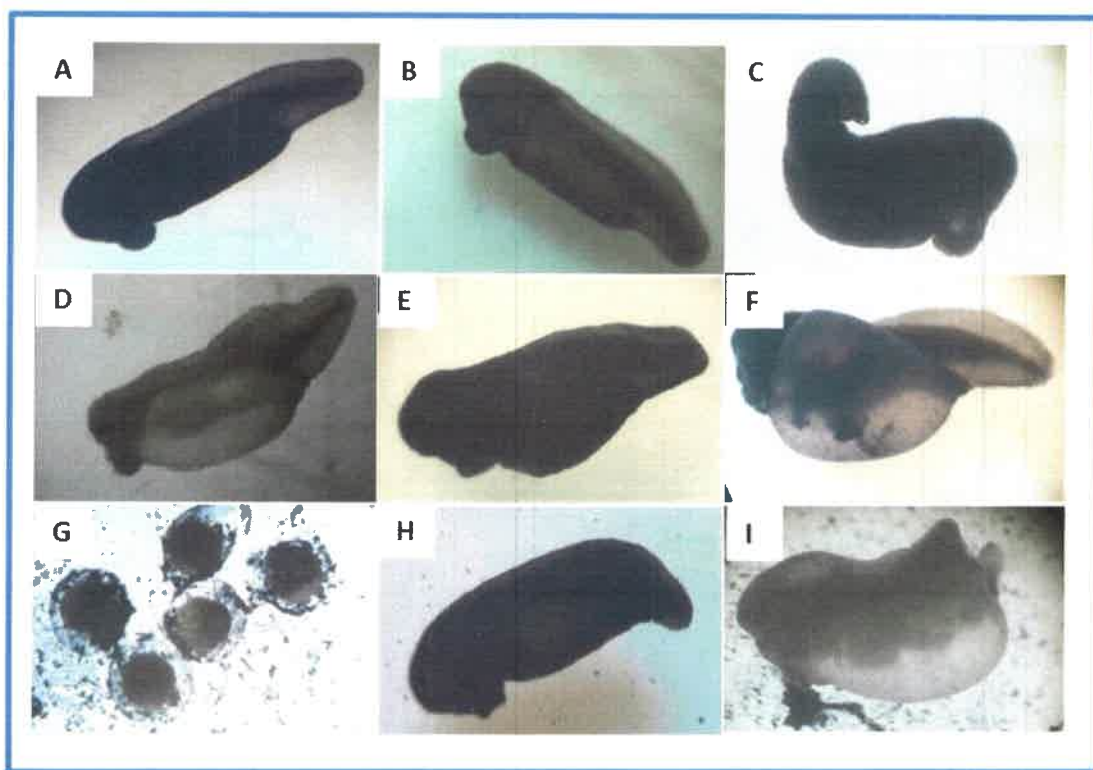


Figura 42: Embriones de *R. arenarum* expuestos a Np-PANI 1 y 2. a) Expuestos a solución Ringer, b) PBS; c y d) expuestos a suspensiones de PVP 2%; e, f y g) expuestos a Np-PANI 1 y h e i) expuestos a Np-PANI 2. Los tipos de malformaciones predominantes observadas fueron: anomalía de cola (c y d), subdesarrollo (e y h), edema generalizado (i), edema cardíaco (d y f) y detenimiento del desarrollo en la etapa gastrular del desarrollo (g).

El tipo de malformación que predominó en la exposición a las Np-PANI 2 fue el retardo en el crecimiento con subdesarrollo de los embriones en S.15 (figura 42h) y en menor medida el edema en S.20 (figura 42i). Malformaciones similares a las observadas cuando se empleó las Np-PANI 1; aunque no se observó crecimiento detenido en la etapa de gástrula tardía S.12, malformación que conducía a la muerte del embrión.

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de los experimentos de letalidad en larvas y teratogénicos en embriones de *R. arenarum* pudimos determinar una mayor susceptibilidad a la exposición de ambas Np-PANI dependiente del estadio de desarrollo de los renacuajos. Por ejemplo, la concentración de Np-PANI 1 necesaria para causar efecto letal es tres veces mayor en larvas S.25 que en los embriones. Este resultado concuerda según lo informado por Yslas et al. (2012) para nanofibras de polianilina<sup>60</sup>. Embriones en etapa temprana son más sensibles que los embriones más maduros frente a la exposición a nanomateriales de polianilina. Hallazgos similares fueron registrados por Hutler Wolkowicz et al. (2013) con el compuesto xenobiótico Epiclorhidrina<sup>63</sup>.

### 8.3.3. Acumulación, distribución y excreción de Np-PANI en larvas S.25 de *R. arenarum*

Cuando se comparó el efecto letal de ambas Np-PANI teniendo en cuenta los datos del análisis PROBIT, se determinó que en el estadio larval S.25 las Np-PANI 2 son más tóxicas que las Np-PANI 1. Este hallazgo se puede atribuir en parte al menor tamaño que tiene las Np-PANI 2, con la consiguiente mayor acumulación en las larvas. Se determinó la acumulación tanto de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en larvas S.25 expuestas a una concentración de 0,5 mg/ml por 96 horas. Cabe aclarar que se empleó esta concentración por no ser tóxica para las larvas en estadio S.25. Los resultados mostraron que cuando las larvas S.25 se incubaron con Np-PANI 1 la cantidad retenida fue de  $\bar{x} = 0,62 \text{ mg} \pm \text{SEM} = 0,05$  cada 10 larvas mientras que para Np-PANI 2 la cantidad retenida era de  $\bar{x} = 0,86 \text{ mg} \pm \text{SEM} = 0,06$  cada 10 larvas. Por lo tanto, es posible sugerir que el contenido intestinal de nanopartículas en las larvas aumentó cuando el tamaño de las nanopartículas fue menor (figura 43). Similares resultados fueron reportados para otros nanomateriales<sup>64-66</sup>.

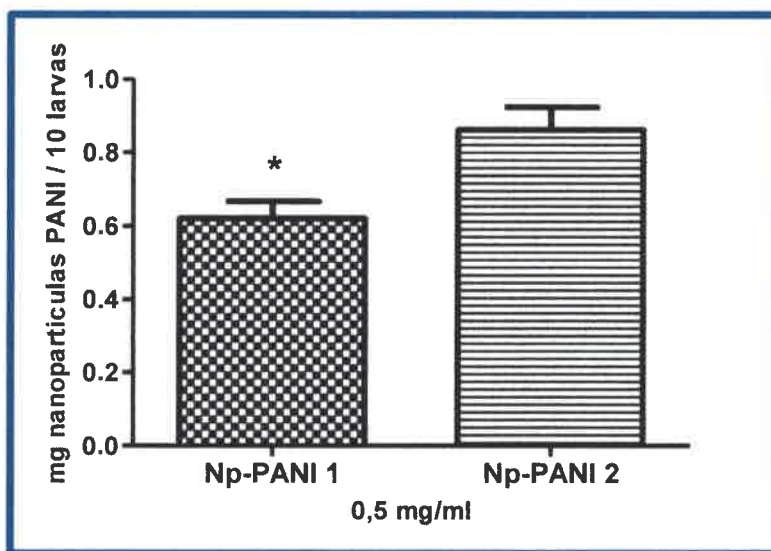


Figura 43: Contenido intestinal de Np-PANI en larvas S.25 de *Rhinella arenarum* expuestas a 0,5 mg/ml de ambas Np-PANI después de 96 h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* indica diferencia estadísticamente significativa entre la exposición de Np-PANI 1 y Np-PANI 2,  $p < 0,05$ .

Por otro lado, se evaluó la eliminación de Np-PANI en larvas S.25 a través del análisis espectrofotométrico de PANI en la materia fecal de larvas expuestas por 24 horas a una concentración de Np-PANI de 0,5 mg/ml, comparándose con la materia fecal de larvas control alimentadas con comida para peces. Los espectros UV-visible de muestras de heces disueltas en NMP o etanol de las larvas tratadas con nanopartículas, correspondieron al espectro característico de PANI (figura 44). Además, pudo determinarse la presencia de Np-PANI macroscópicamente como acúmulos de color azul oscuro en las heces observada bajo lupa de las larvas expuestas, en contraste con las muestras de heces del grupo control (figura 45).

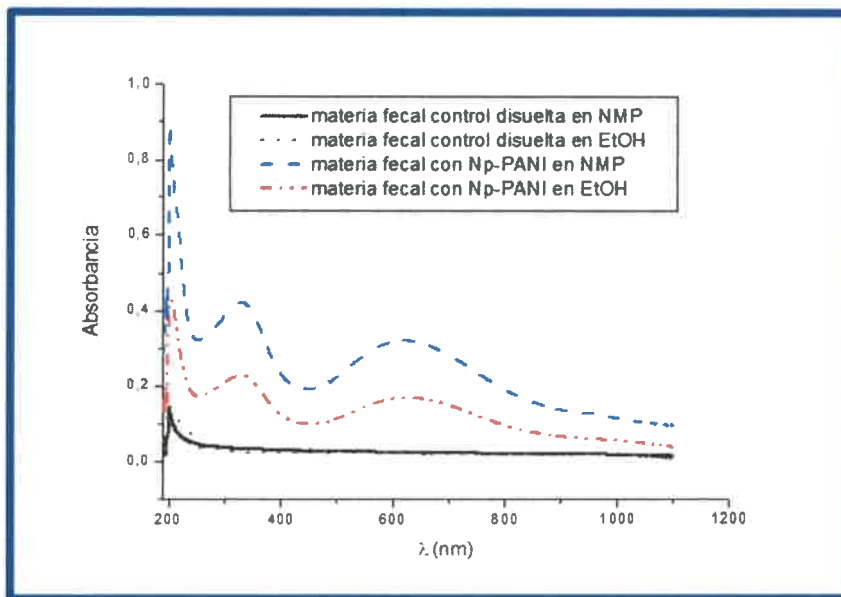


Figura 44: Espectros UV-visibles de muestras de materia fecal disueltas en NMP y EtOH

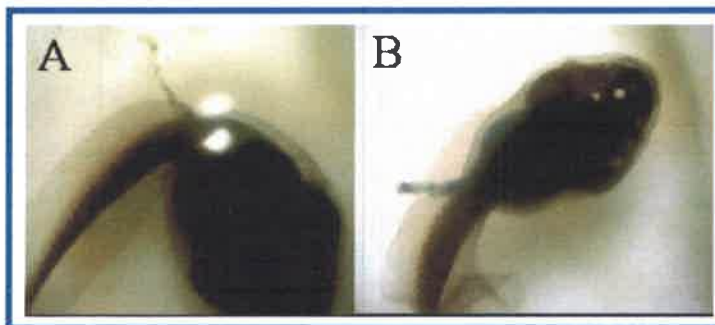
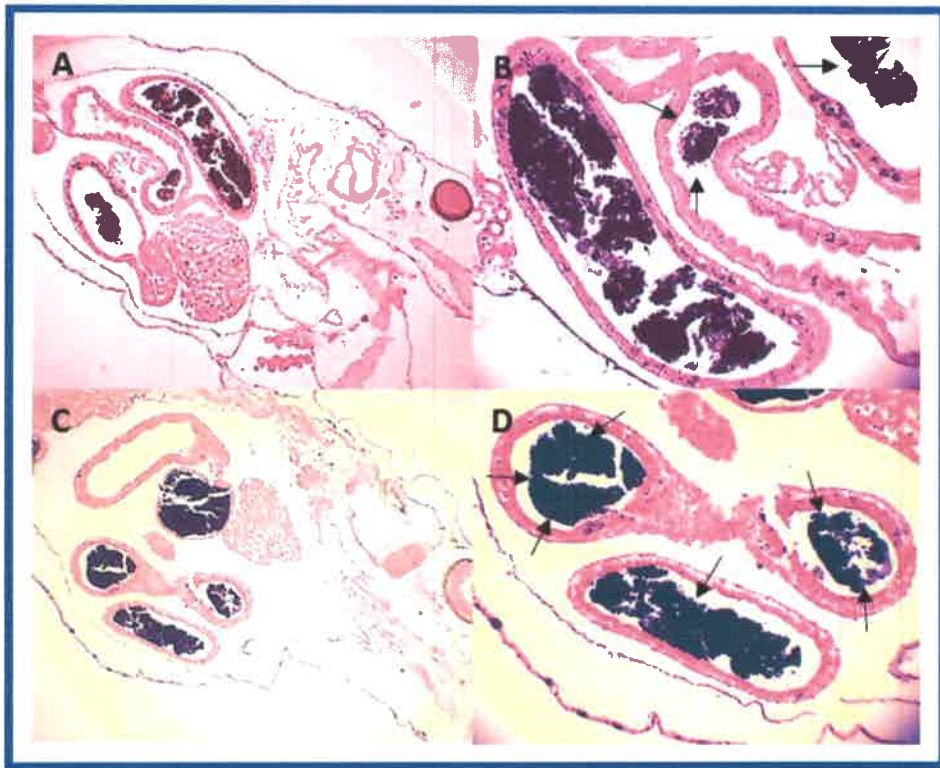


Figura 45: Larvas S.25 observadas bajo lupa estereotípica: a) control alimentado con alimento para peces, nótese materia fecal de color claro y b) larvas expuestas a Np-PANI 1 donde se puede visualizar la presencia de las nanopartículas en materia fecal.

Cuando se produce la exposición en la etapa larval S.25, las nanopartículas se acumulan principalmente en el tubo digestivo a través de su ingreso vía oral. En nuestro estudio, se observó la presencia de nanopartículas en las heces de las larvas asumiendo que las partículas pasan a través del tracto digestivo. Teniendo en cuenta que estas nanopartículas también pueden ingresar al organismo vía transdérmica especialmente en anfibios que presentan una piel muy permeable, se realizaron estudios histopatológicos con el fin de identificar acúmulos de nanopartículas en las capas cutáneas y/o en otros órganos internos, además de evaluar posibles efectos tóxicos.



*Figura 46: Cortes histológicos sagitales de larvas S.25 luego de la exposición a Np-PANI 1 y Np-PANI 2 (0,5 mg/ml). a) Cabeza y cavidad abdominal con presencia de acúmulos de Np-PANI 1 en aparato digestivo (4X) y b) cortes transversales de intestino delgado con Np-PANI 1 en la luz del órgano (flechas) (10X). c) Cabeza y cavidad abdominal con acúmulos de Np-PANI 2 en aparato digestivo (4X) y d) cortes transversales de intestino delgado y grueso con presencia de aglomerados de Np-PANI 2 en la luz (10X).*

Los órganos del sistema digestivo fueron los sitios de acumulación de las Np-PANI 1 y Np-PANI 2 tanto en el estómago, como el intestino delgado y grueso (figura 46). No se encontraron diferencias estructurales entre los grupos tratados con nanopartículas y los controles. La estructura histológica de estos órganos se mostró conservada, sin solución de continuidad de los epitelios. Tampoco se observaron células inflamatorias en ellos. En el intestino delgado además de las nanopartículas, se observó



la presencia de detrito celular, lo que estaría sugiriendo un alto recambio del epitelio intestinal producto del contacto con las Np-PANI (figura 47).

El tracto digestivo y la epidermis generalmente representan dos de las vías más importantes de ingreso de las Np-PANI para los estadios larvales y embrionarios de anfibios. Las Np-PANI utilizarían una u otra vía de ingreso dependiendo del estadio de desarrollo de *R. arenarum*. En embriones probablemente la vía principal de ingreso sea transdérmica, a través de la adhesión de las Np-PANI a las células del ectodermo y la consiguiente generación de malformaciones. Mientras que, en los estadios larvales (S.25. de *R. arenarum*), el tracto digestivo será la vía de ingreso más importante. En este estadio no se observaron alteraciones en la piel de las larvas, lo que sugiere que estas nanopartículas son probablemente incapaces de ingresar a través de esta ruta. Los renacuajos de los anfibios son filtradores por lo que es posible que una vez desarrollado el aparato bucal comiencen a ingerir las nanopartículas. Resultados similares fueron reportados por Bacchetta y col. en larvas de *Xenopus laevis* empleando nanopartículas de metales oxidados como  $\text{CuO}_2$ ,  $\text{TiO}_2^{67}$ , aunque con presencia de lesiones en los órganos digestivos producto de la interacción con estas nanopartículas.

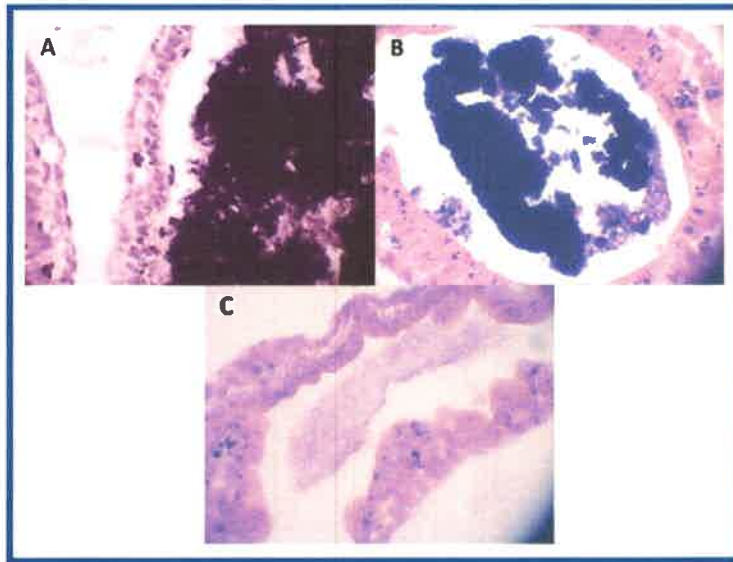


Figura 47: Cortes histológicas de larvas S.25 de *R. arenarum* (40X). a) y b) Secciones de intestino delgado con aglomerados de Np-PANI 1 y Np-PANI 2 en la luz intestinal respectivamente y presencia de debris celulares. c) Intestinos delgados de larvas control alimentadas con alimento de peces.

El uso de modelos *in vivo* para realizar ensayos de toxicidad de nanomateriales está incrementándose y son de carácter obligatorio cuando se desea aplicar potencialmente nanotecnología a diferentes áreas como la medicina. El uso de este tipo de modelos que no emplean mamíferos ha brindado una solución alternativa para sustituir

el empleo de mamíferos siempre que sea posible; los cuales cada vez están siendo más reconocidos como modelos válidos para el estudio de las enfermedades humanas<sup>68</sup>.

De acuerdo a los resultados *in vitro* con ambas Np-PANI donde la TFT con Np-PANI 1 resultó más eficaz, promoviendo la muerte celular en tiempos más cortos de incubación en modelos de cultivo 2D, como también una mayor eficacia en modelos de cultivo 3D; es que se propuso continuar con los ensayos *in vivo* con las Np-PANI 1. Los ensayos con larvas de *R. arenarum* confirmaron una mayor toxicidad de Np-PANI 2, lo que también contribuyó a la decisión de continuar los estudios en ratones solamente con las Np-PANI 1.

#### **8.4. Experimentos *in vivo* en ratones Balb/c**

##### **8.4.1. Toxicidad *in vivo* de Np-PANI en ratones Balb/c**

Pruebas de toxicidad sistémica se utilizan para abordar la evaluación de la toxicidad sistémica generalizada, la toxicidad no específica a órganos blancos y/o la toxicidad a determinados órganos, a pesar de que estos efectos pueden ser el resultado de la absorción sistémica y la distribución de sustancias tóxicas. Con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico *in vivo* de las Np-PANI 1, se evaluaron diversos parámetros bioquímicos tales como: transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), urea y creatinina. Estos parámetros se utilizan comúnmente por ser considerados indicadores del estado y funcionalidad de los órganos depuradores (hígado y riñón), de compuestos xenobióticos que se encuentran presentes en el suero.

Para esto, se testeó la concentración de 1 mg/ml de Np-PANI 1 con la cual se logró el efecto fototérmico en las células en monocapa en los experimentos *in vitro* y cuya concentración se acerca la NOEC obtenida en los experimentos de toxicidad en larvas de *R. arenarum*.

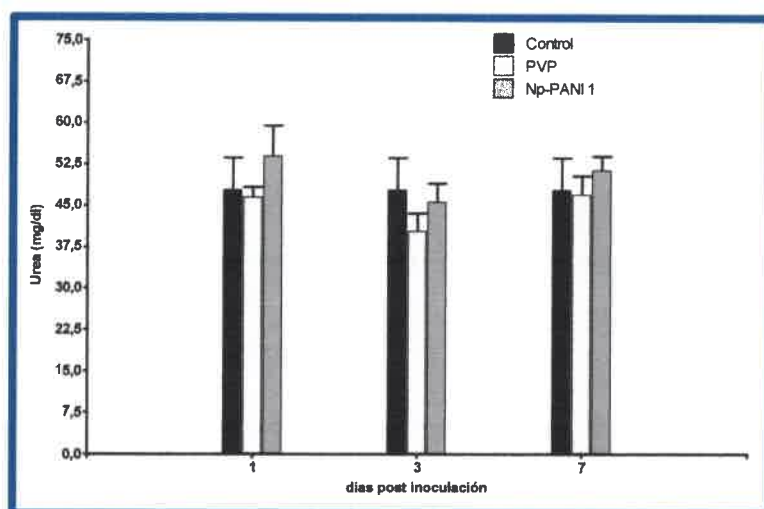


Figura 48: Valores séricos de urea (mg/dl) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento.

Para realizar este experimento se utilizaron ratones Balb/c, a los que se le administró por vía endovenosa una suspensión de 200  $\mu$ l de Np-PANI 1 en PBS (4 veces más volumen del que se utilizará posteriormente en los tratamientos fototérmicos y la cual se corresponde con  $\approx$  14,4 mg/kg de peso corporal). Luego se obtuvieron muestras de sangre a diferentes tiempos (1, 3 y 7 días post inyección). En ellas no hubo diferencias estadísticas significativas en la concentración de creatinina, urea y GPT, entre los ratones del grupo control y los ratones tratados con Np-PANI y PVP a los distintos tiempos estudiados. Los valores de estos parámetros se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos (figuras 48, 49 y 50). Además, durante el tiempo de seguimiento de los ratones no se observaron diferencias en cuanto al peso de los mismos, como tampoco cambios de comportamiento. A la necropsia de los animales; no se detectó la presencia de lesiones macroscópicas en órganos como hígado, riñón, intestino, corazón y cerebro en los ratones tratados con Np-PANI 1. Estos resultados sugieren que estas Np-PANI 1 dispersadas en PVP 2% no causan efectos adversos sistémicos como tampoco alteraciones en órganos de depuración que pudieran elevar los niveles de parámetros bioquímicos.

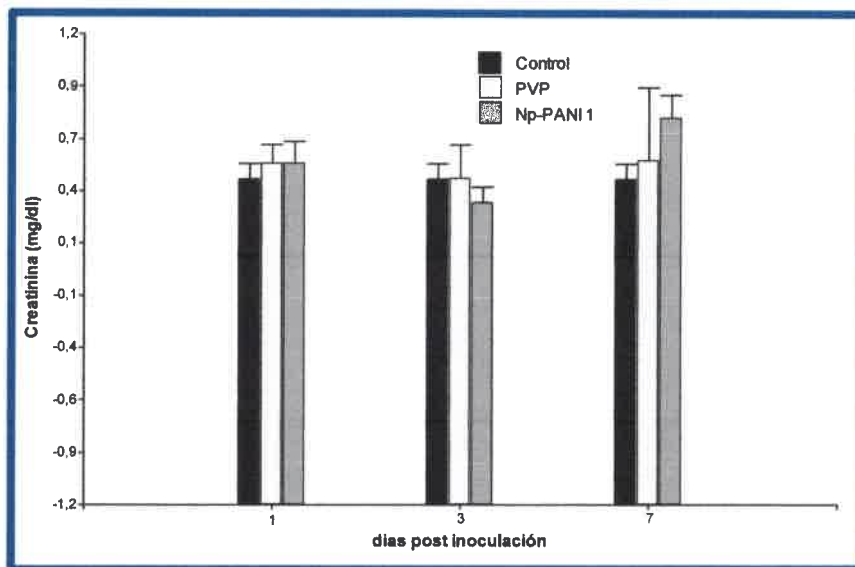


Figura 49: Valores séricos de creatinina (mg/dl) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento.

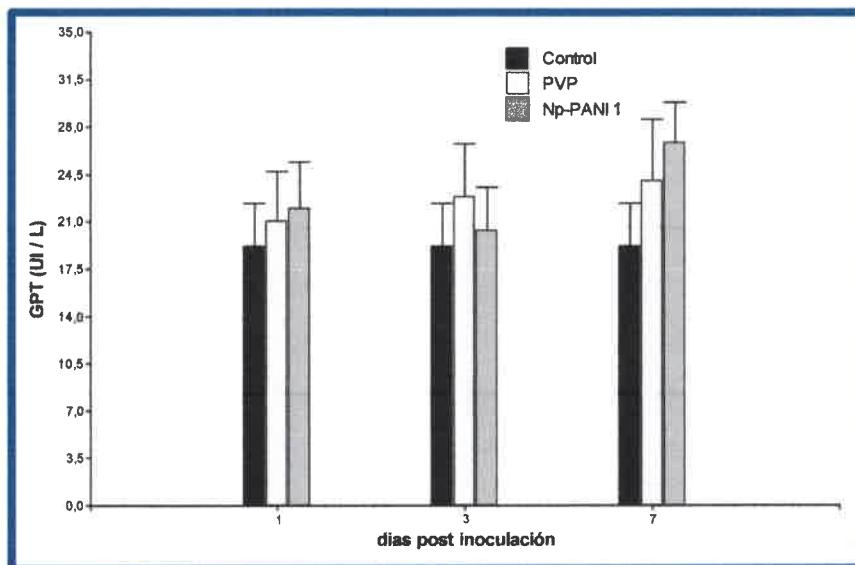
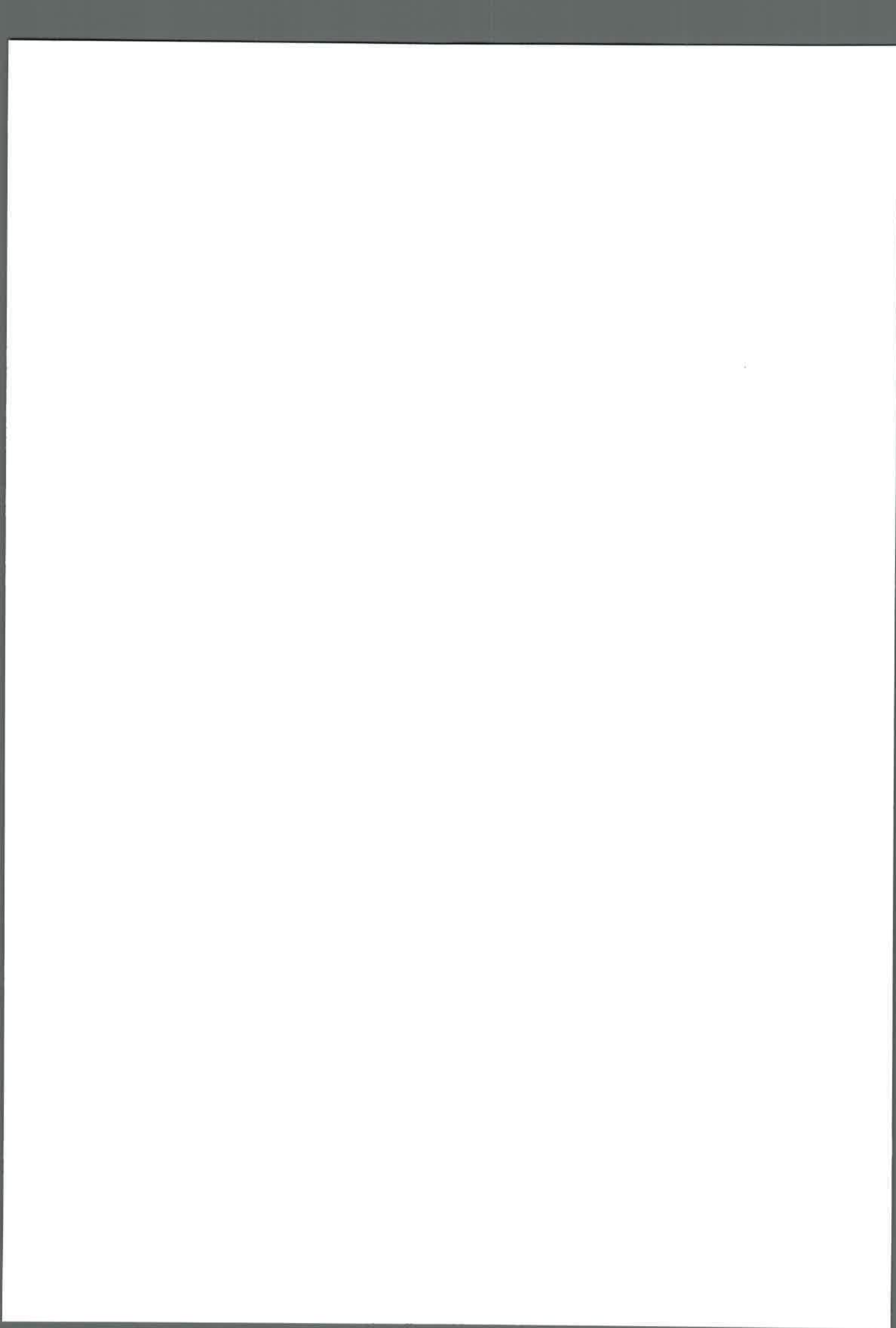


Figura 50: Valores séricos de GPT (UI/L) obtenidos a diferentes tiempos de ratones inyectados EV con Np-PANI 1 (14,4 mg/kg de peso corporal), con PVP 2% en PBS y controles sin ningún tipo de tratamiento.

#### 8.4.2. Terapia fototérmica en ratones portadores de tumores

Con el propósito de evaluar la eficacia de la terapia fototérmica en ratones portadores de tumores, se procedió a administrar por vía IT una suspensión de 50  $\mu$ l Np-PANI 1 (1 mg/ml que corresponde con  $\approx$  3,6 mg/Kg de peso vivo), y luego de 3 horas se iluminó la zona del tumor con luz NIR proveniente del láser utilizado en los experimentos *in vitro* con igual dosis de luz. Durante este tiempo se monitorió los  $\Delta T$  °C en la zona de





proyección tumoral y se pudo detectar un aumento de 4 °C en la zona medido a través de un termómetro láser digital infrarrojo.

Luego de la terapia se evaluó el crecimiento tumoral en el tiempo (10 días) en los distintos grupos tratados (control, control luz, PVP + luz, Np-PANI sin irradiación y Np-PANI + luz) (figura 51).

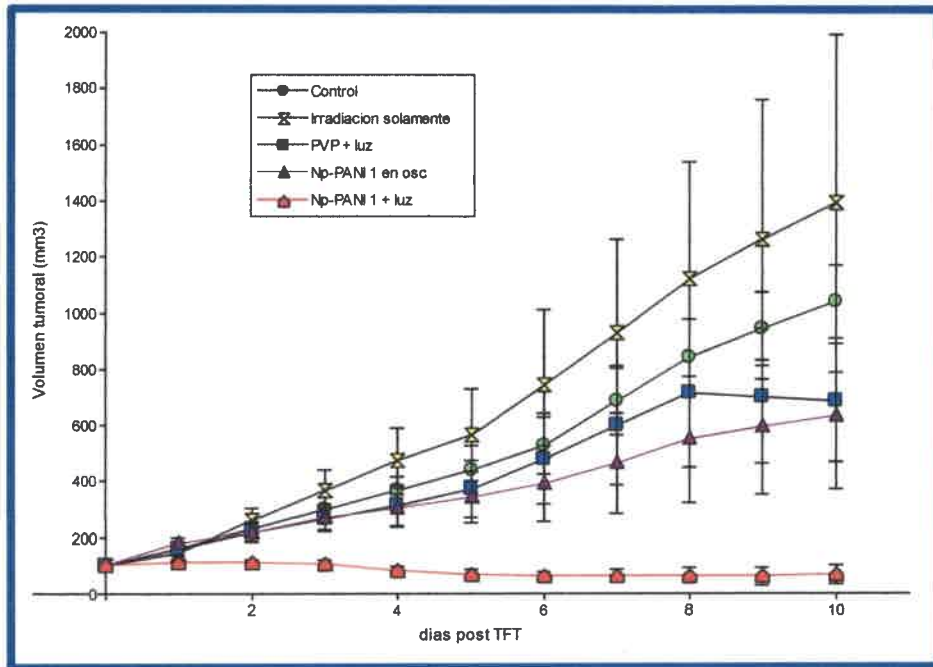
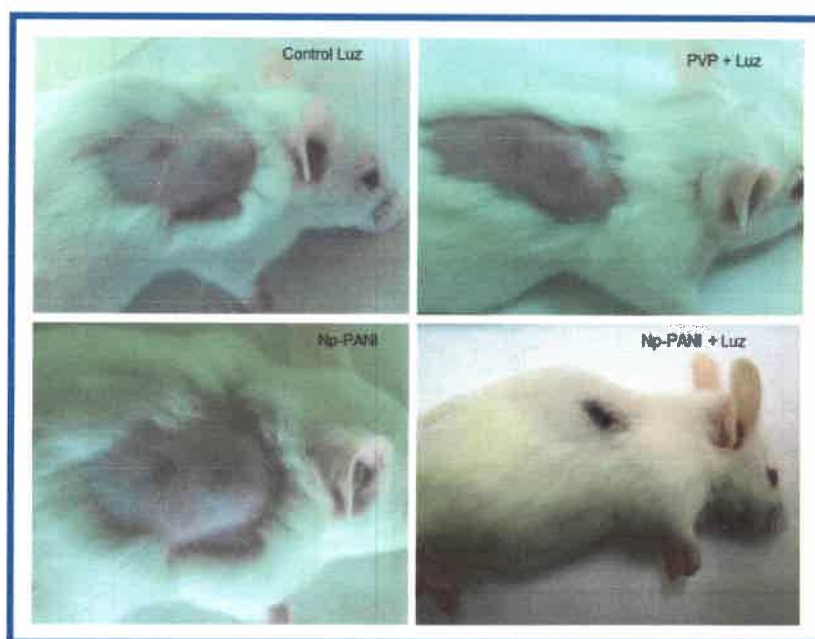


Figura 51: Crecimiento de los tumores LM2 en ratones de los distintos grupos de tratamiento después de la aplicación de TFT.

Los resultados obtenidos muestran que en los primeros tres días post TFT no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los volúmenes tumorales de los ratones sometidos a los distintos tratamientos. Luego de este tiempo, el volumen tumoral del grupo Np-PANI 1 e irradiado fue significativamente menor que el resto de los grupos controles. Si bien no se observaron diferencias estadísticas significativas en los volúmenes tumorales en los 3 primeros días, macroscópicamente a partir de las 24 horas se pudo observar la presencia de lesiones por quemaduras con eritema en la piel de los tumores en los ratones tratados con la combinación de NP-PANI 1 y luz, las cuales fueron evolucionando a lesiones oscuras y necróticas con el paso de los días (figura 52).



*Figura 52: Fotografías de ratones portadores de tumores pertenecientes a los distintos grupos tratamientos 7 días post terapia fototérmica. Nótese en el grupo Np-PANI 1 + luz, la disminución significativa del tumor como también la formación de una cicatriz por quemadura en la zona del tumor.*

A partir del 4° día post tratamiento se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el volumen promedio tumoral del grupo tratamiento Np-PANI 1 + luz con respecto a los demás grupos controles. Estas diferencias se mantuvieron en los días restantes de seguimiento de los volúmenes tumorales. Cabe aclarar que no se observaron diferencias estadísticas en los volúmenes tumorales entre los grupos control, control oscuro y el grupo control luz en todo el periodo de seguimiento post TFT, indicando que es necesario la combinación de ambos elementos (Np-PANI 1 + luz) para promover la regresión tumoral. Los tumores de cinco de los ocho ratones inyectados IT con Np-PANI 1 e irradiados desaparecieron completamente 7 días después de la terapia, dejando cicatrices en los sitios del tumor. En estos animales no se registró recidivas ni metástasis en otros órganos dentro de los tres meses posteriores al tratamiento. Además no se observaron cambios en los pesos de los animales como tampoco cambios de comportamiento ni del estado general de los mismos indicando la tolerancia a la TFT.

### **8.4.3. Estudios post terapia fototérmica en ratones portadores de tumores**

#### **8.4.3.1. Viabilidad de tumores por tinción con azul de Evans**

A través de la tinción de azul de Evans, tinción que permite distinguir el tejido vital de aquel que está muerto, administrada 24 horas post TFT, se observó que los

tumores de los grupos control, control luz y PVP + luz, se teñieron en casi su totalidad, lo que indicaría que no ocurrió muerte celular en estos tumores (figura 53 a, b y c). Mientras que, en el grupo de Np-PANI 1 + irradiación se registraron grandes áreas de necrosis tumoral (figura 53 d y e). Mediante esta técnica solamente se colorean las áreas de tejido vivo. Aquellas áreas tumorales necróticas permanecen sin teñirse, debido a un efecto directo sobre las células tumorales o trastornos estructurales y funcionales en la microcirculación.

La zona de necrosis tumoral se midió en cortes obtenidos de los mismos. En el grupo de Np-PANI 1 + luz, el porcentaje de necrosis en el tumor (tejido no teñido) fue del 64% en promedio, mientras que en los otros grupos no alcanzo al 5%. Este hallazgo refuerza los resultados obtenidos en el experimento anterior, donde cinco de los ocho ratones tratados mostraron desaparición total del tumor a los 7 días post terapia.



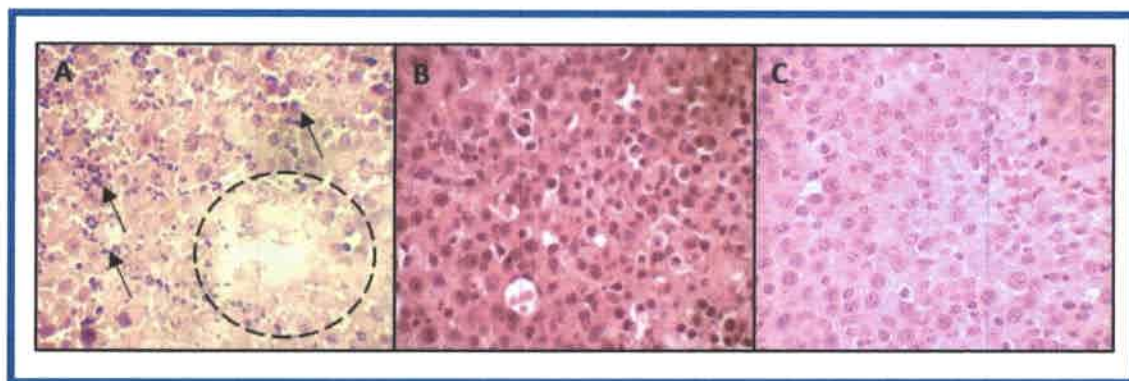
Figura 53: Tumores luego de la TFT teñidos con azul de Evans; a) Control, b) Control luz, c) PVP + irradiación, d) Np-PANI 1 en condiciones de oscuridad, e y f) Np-PANI 1 + irradiación con láser NIR.

#### 8.4.3.2. Histopatología de tumores y órganos

El examen histopatológico de los tumores tratados con el Np-PANI 1 y luz NIR mostró un daño celular grave, con grandes áreas de necrosis y áreas con morfología celular compatible con muerte celular por apoptosis (cariopiconosis, cariorrexis y



citoplasmas acidófilos) (figura 54a). Además se observó presencia de células inflamatorias y hemorragias con rupturas de vasos sanguíneos en comparación con el grupo control (figura 54b) y tumores solamente irradiados con el láser (figura 54c). En resumen, nuestros resultados demostraron que la combinación de Np-PANI 1 y luz NIR es una terapia fototérmica que logra ablación tumoral altamente eficaz y factible.



*Figura 54: Cortes histológicos de tumores 7 días luego de TFT teñidos con H&E. a) Empleando Np-PANI 1 (3,6 mg/kg por vía IT) e irradiación con láser NIR (15 min a una potencia de 500 mW/cm<sup>2</sup>) (400X). Se muestra una gran área de necrosis con celulares sin núcleo y detritos (circulo con líneas punteadas). Las células tumorales mostraron diferentes tipo de muerte celular con cariopicnosis, cariorrexis y lisis celular (flechas señalan células apoptóticas). b) Control de Np-PANI 1 en condiciones de oscuridad. La organización del tejido tumoral está bien conservada y es típica de este tipo de tumor. c) Tumores 7 días después de TFT con PBS IT e irradiación con láser NIR. La organización del tejido tumoral está bien conservado y no se observan zonas de muerte celular.*

Por otro lado, se evaluó la potencial toxicidad de Np-PANI 1 después de 10 días de la terapia fototérmica intratumoral, en los órganos tales como el hígado, el bazo, y el riñón (figura 55). En el hígado de los animales tratados con Np-PANI 1 en condiciones de irradiación y sin irradiación, se observaron cambios histopatológicos tales como: la presencia de congestión sinusoidal con un leve grado de dilatación de los espacios sinusoidales y una inflamación lobulillar leve, además de la infiltración de células inflamatorias mononucleares (macrófagos). Los hepatocitos se mostraron levemente degenerados con hinchazón celular y algunas células con degeneración vacuolar. Si bien, estas lesiones aparecieron distribuidas al azar en todo el parénquima, no se observaron cambios compatibles con necrosis hepática, lo cual indicaría una leve inflamación del parénquima considerada de tipo reversible. Por otro lado, el grupo control y el tratado con PVP no mostraron ninguno de estos cambios.

En el bazo, no se observaron lesiones histopatológicas en ninguno de los grupos tratados. Las secciones de bazo mostraron la arquitectura esplénica normal con los folículos y senos linfoides conservados.

Con respecto al riñón, en las secciones de tejidos de los grupos control y PVP + luz se observó una arquitectura normal con glomérulos, túbulos y papilas renales conservados. Sólo se observó algo de tumefacción turbia en el epitelio tubular de la zona cortical en el grupo Np-PANI 1 sin irradiación. En el grupo Np-PANI 1 + luz, la luz de algunos túbulos renales se hallaron con líquido proteico y se observó una ligera infiltración de células inflamatorias en la zona cortical. Estas respuestas inflamatorias son consideradas muy leves y no presentes en todo el órgano como para alterar la funcionalidad. Los cambios histopatológicos observados en los órganos de los grupos tratados con Np-PANI 1 podrían sugerir una leve toxicidad con daños leves y reversibles, y pueden estar asociados a la biodistribución y acumulación de las Np-PANI 1 en estos órganos. Diferentes trabajos muestran que muchas de las nanopartículas administradas *in vivo*, pueden terminar impactando en órganos de depuración como el hígado y riñón dependiendo del tamaño, carga, funcionalización de las mismas. Mientras más pequeñas sean las partículas; mayor será la distribución a diferentes tejidos<sup>69-72</sup>. Si bien, en nuestro estudio, no pudimos determinar la biodistribución de las Np-PANI 1, creemos que estos efectos de mayor acumulación de células inflamatorias en los hígados y riñones en los grupos tratados con Np-PANI 1 pueden deberse a la presencia de nanopartículas. Aunque estas no producirían alteraciones en la funcionalidad de estos órganos, ni tampoco en parámetros fisiológicos generales como peso, comportamiento, estado general de los ratones.

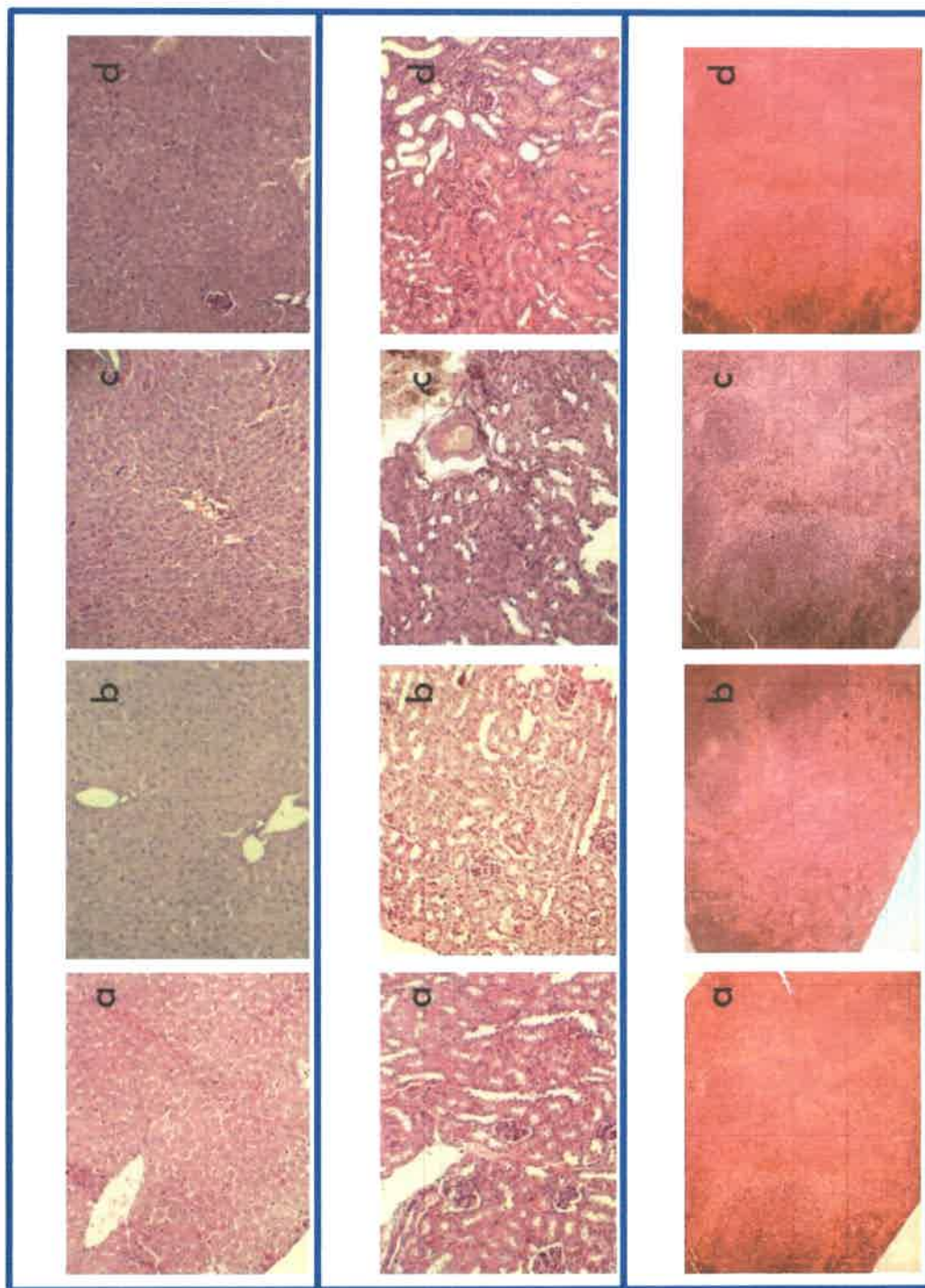


Figura 55: Cortes histológicos de órganos de los distintos grupos tratamientos. a) Control irradiación, b) PVP e irradiación, c) Np-PANI 1 en condiciones de oscuridad y d) Np-PANI 1 e irradiación.

8.4.3.3. *Bioquímica sanguínea de parámetros fisiológicos de funcionalidad de órganos*

Por otra parte, 10 días después de la TFT, se les extrajo sangre a los ratones tratados con una concentración de Np-PANI 1 de 3,6 mg/kg de peso corporal vía intratumoral, y a los ratones de los grupos controles por vía intracardiaca al momento de la eutanasia. A partir de los ensayos bioquímicos evaluados se pudo demostrar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de creatinina, urea y GPT en suero entre ninguno de los grupos tratados. Los valores se encontraron dentro de los rangos fisiológicos esperados (figura 56). Estos resultados sugieren que las Np-PANI 1 no causan efectos funcionales adversos de riñón e hígado. Los datos se corresponden con los obtenidos mediante el análisis histopatológico de los órganos, donde solo se observaron lesiones inflamatorias consideradas muy leves e incapaces de producir alteraciones funcionales.

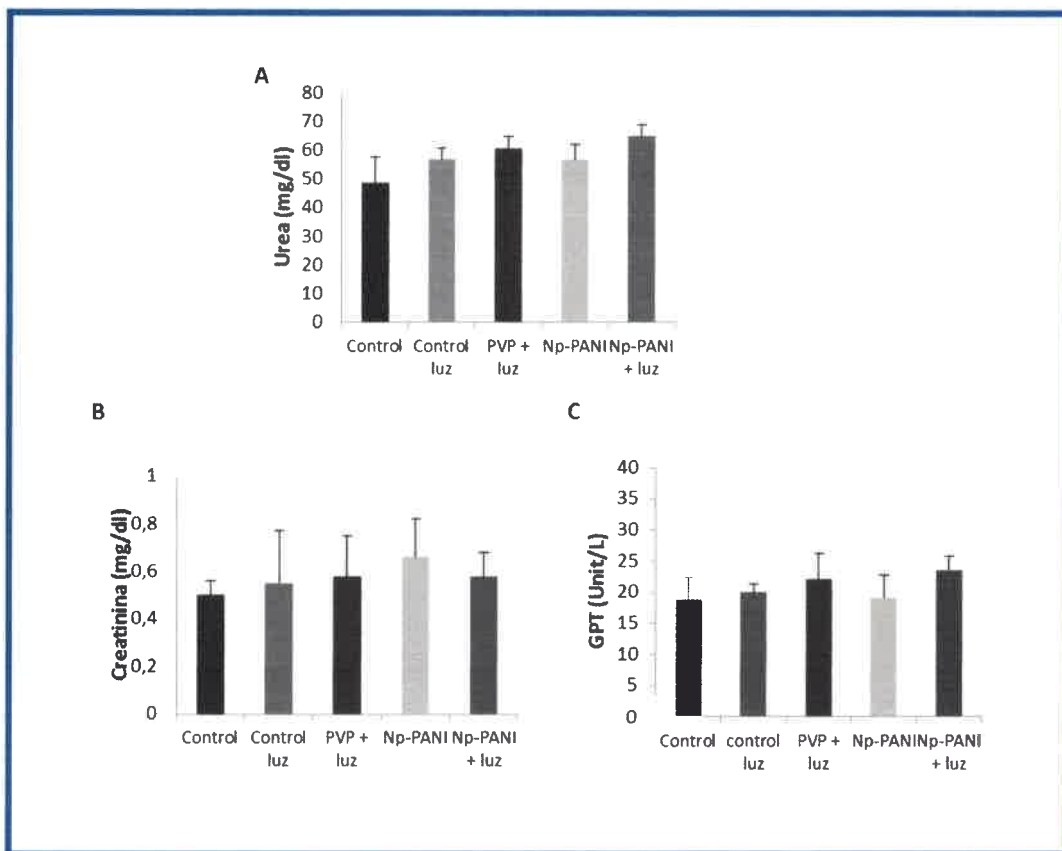


Figura 56: Niveles de urea (a), creatinina (b) y GPT (c) en suero de ratones portadores de tumores pertenecientes a los distintos grupos tratamientos (control, control luz, PVP + luz, Np-PANI 1 y Np-PANI + luz 10 días post TFT).



En resumen, se pudo establecer un protocolo de tratamiento antitumoral empleando nanopartículas de polianilina, un polímero semiconductor, en una terapia en fases iniciales de experimentación hasta el momento, denominada terapia fototérmica. Se ha podido demostrar la capacidad de nanopartículas de PANI, dispersadas en medios acuosos con la ayuda de otros polímeros estabilizantes, de sensibilizar células tumorales *in vitro* y por ende desencadenar muerte celular, combinándolas con la irradiación de luz NIR emitida de una fuente luz láser monocromática y coherente a 785 nm.

Por otro parte, los resultados favorables obtenidos *in vitro* sumado a la baja toxicidad determinada a través de modelos *in vivo*; permitieron implementar un protocolo de tratamiento TFT en un modelo con ratones portadores de tumores. Los resultados obtenidos en ratones mostraron un importante efecto de ablación tumoral post TFT con estas nanopartículas, con nulos efectos tóxicos en órganos vitales y sin alteración de la funcionalidad de los mismos. Por lo tanto, se pudo desarrollar un tratamiento fotoasistido con nanopartículas para ser implementado en enfermedades tumorales.



**Bibliografía**

1. Shannigrahi, M. & Bagchi, S. Influence of a neutral polymer (PVP) on the solvatochromic properties of SDS micelles. *J. Phys. Chem. B* **109**, 14567–72 (2005).
2. Stejskal, J. *et al.* Purification of a conducting polymer, polyaniline, for biomedical applications. *Synth. Met.* **195**, 286–293 (2014).
3. Acevedo, D. A., Lasagni, A. F., Barbero, C. A. & Mücklich, F. Simple Fabrication Method of Conductive Polymeric Arrays by Using Direct Laser Interference Micro-/Nanopatterning. *Adv. Mater.* **19**, 1272–1275 (2007).
4. Lee, E. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J. Control. Release* **91**, 103–113 (2003).
5. Lee, E. S., Gao, Z. & Bae, Y. H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *J. Control. Release* **132**, 164–70 (2008).
6. He, X., Li, J., An, S. & Jiang, C. pH-sensitive drug-delivery systems for tumor targeting. *Ther. Deliv.* **4**, 1499–510 (2013).
7. Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **9**, 123–8 (2003).
8. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **19**, 316–7 (2001).
9. Stolik, S., Delgado, J. a, Pérez, a & Anasagasti, L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. *J. Photochem. Photobiol. B.* **57**, 90–3 (2000).
10. Zhang, P., Steelant, W., Kumar, M. & Scholfield, M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4526–7 (2007).
11. Wang, C., Tao, H., Cheng, L. & Liu, Z. Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials* **32**, 6145–54 (2011).
12. Schulze, C. *et al.* Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* **2**, 51–61 (2008).
13. Wu, L., Zhang, J. & Watanabe, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 456–69 (2011).
14. Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro* **12**, 251–8 (1998).

15. Siennicka, J., Gut, W., Zuk, A. & Litwińska, B. [Cytotoxicity of DMSO for MRC5, Chang liver and CV1 cells evaluated in vitro by LK, MTT and NR assays]. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **55**, 157–64 (2003).
16. Borenfreund, E., Babich, H. & Martin-Alguacil, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* **2**, 1–6 (1988).
17. Schrand, A. M., Lin, J. B. & Hussain, S. M. Assessment of cytotoxicity of carbon nanoparticles using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) cell viability assay. *Methods Mol. Biol.* **906**, 395–402 (2012).
18. Love, S. A., Maurer-Jones, M. A., Thompson, J. W., Lin, Y.-S. & Haynes, C. L. Assessing nanoparticle toxicity. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)* **5**, 181–205 (2012).
19. Iversen, T.-G., Skotland, T. & Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **6**, 176–185 (2011).
20. Kucekova, Z. *et al.* Colloidal polyaniline dispersions: antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **116**, 411–7 (2014).
21. Sokolova, V. *et al.* Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta Biomater.* **9**, 7527–35 (2013).
22. Fernando, L. P. *et al.* Mechanism of cellular uptake of highly fluorescent conjugated polymer nanoparticles. *Biomacromolecules* **11**, 2675–82 (2010).
23. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. & Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 3657–66 (2010).
24. Thurn, K. T. *et al.* Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine* **7**, 123–30 (2011).
25. Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S. & Kumar, A. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS ...* **2**, 1001–1014 (2012).
26. Casas, A. *et al.* ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *Br. J. Cancer* **86**, 837–42 (2002).
27. Stern, S. T., Adiseshaiah, P. P. & Crist, R. M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 20 (2012).

28. Choi, E. B. *et al.* Colourimetric redox-polyaniline nanoindicator for in situ vesicular trafficking of intracellular transport. *Nano Res.* (2014). doi:10.1007/s12274-014-0597-6
29. Verma, A. & Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* **6**, 12–21 (2010).
30. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–69 (2004).
31. Zhou, J. *et al.* NIR photothermal therapy using polyaniline nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 9584–92 (2013).
32. Xu, P., Xu, J., Liu, S. & Yang, Z. Nano copper induced apoptosis in podocytes via increasing oxidative stress. *J. Hazard. Mater.* **241-242**, 279–86 (2012).
33. Park, E.-J. & Park, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* **184**, 18–25 (2009).
34. Pulskamp, K., Diabaté, S. & Krug, H. F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett.* **168**, 58–74 (2007).
35. Passagne, I., Morille, M., Rousset, M., Pujalté, I. & L'azou, B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology* **299**, 112–24 (2012).
36. Manke, A., Wang, L. & Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res. Int.* **2013**, 942916 (2013).
37. Hiura, T. S., Kaszubowski, M. P., Li, N. & Nel, A. E. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* **163**, 5582–91 (1999).
38. Hiura, T. S. *et al.* The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J. Immunol.* **165**, 2703–11 (2000).
39. Markovic, Z. M. *et al.* In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* **32**, 1121–9 (2011).
40. Mocan, T. *et al.* Photothermal Treatment of Human Pancreatic Cancer Using PEGylated Multi-Walled Carbon Nanotubes Induces Apoptosis by Triggering Mitochondrial Membrane Depolarization Mechanism. *J. Cancer* **5**, 679–88 (2014).
41. Dewhirst, M. W. *et al.* Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future. *Semin. Oncol.* **24**, 616–25 (1997).



42. Falk, M. H. & Issels, R. D. Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperthermia* **17**, 1–18 (2001).
43. Yu, C. *et al.* Lysosome dysfunction enhances oxidative stress-induced apoptosis through ubiquitinated protein accumulation in Hela cells. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **296**, 31–9 (2013).
44. Pivtoraiko, V. N., Stone, S. L., Roth, K. A. & Shacka, J. J. Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 481–96 (2009).
45. Halamoda Kenzaoui, B., Chapuis Bernasconi, C., Guney-Ayra, S. & Juillerat-Jeanneret, L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem. J.* **441**, 813–21 (2012).
46. Wenzel, C. *et al.* 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp. Cell Res.* **323**, 131–43 (2014).
47. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
48. Padmalayam, I. & Suto, M. J. *3D Cell Cultures : Mimicking In Vivo Tissues for Improved Predictability in Drug Discovery.* *Annu. Rep. Med. Chem.* **47**, 367–378 (Elsevier Inc., 2012).
49. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* **31**, 108–15 (2013).
50. Alemany-Ribes, M., García-Díaz, M., Busom, M., Nonell, S. & Semino, C. E. Toward a 3D cellular model for studying in vitro the outcome of photodynamic treatments: accounting for the effects of tissue complexity. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1665–74 (2013).
51. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. a. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* **4**, 309–24 (2009).
52. Villalba, P. *et al.* Cellular and in vitro toxicity of nanodiamond-polyaniline composites in mammalian and bacterial cell. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 594–598 (2012).
53. Humpolicek, P., Kasparkova, V., Saha, P. & Stejskal, J. Biocompatibility of polyaniline. *Synth. Met.* **162**, 722–727 (2012).
54. Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C. J., Brain, R. A. & Solomon, K. R. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol. Lett.* **144**, 383–95 (2003).

55. Blaise, C., Gagné, F., Féraud, J. F. & Eullaffroy, P. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* **23**, 591–8 (2008).
56. Salvaterra, T. *et al.* Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). *Aquat. Toxicol.* **128-129**, 190–2 (2013).
57. Kahru, A. & Dubourguier, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* **269**, 105–19 (2010).
58. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622–7 (2006).
59. Ivask, A. *et al.* Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* **9**, e102108 (2014).
60. Yslas, E. I. *et al.* Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere* **87**, 1374–80 (2012).
61. Kato, Y. & Nagao, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology* **72**, 624–35 (2009).
62. Bantle, J. & Sabourin, T. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *Am. Soc. Test. Mater. E1439* **98**, 1–20 (1991).
63. Hutler Wolkowicz, I. R., Aronzon, C. M. & Pérez Coll, C. S. Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *J. Hazard. Mater.* **263 Pt 2**, 784–91 (2013).
64. Lanone, S. & Boczkowski, J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.* **6**, 651–63 (2006).
65. Chen, Z. *et al.* Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett.* **163**, 109–20 (2006).
66. Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M. & Möller, W. Health implications of nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **8**, 543–562 (2006).
67. Bacchetta, R. *et al.* Nano-sized CuO, TiO<sub>2</sub> and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology* **6**, 381–98 (2012).
68. Giannaccini, M., Cuschieri, A., Dente, L. & Raffa, V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 703–719 (2014).
69. Xiao, K. *et al.* The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3435–46 (2011).

70. Hirn, S. *et al.* Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 407–16 (2011).
71. Semete, B. *et al.* In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 662–671 (2010).
72. Dispenza, C. *et al.* Optical properties of biocompatible polyaniline nanocomposites. *J. Non. Cryst. Solids* **352**, 3835–3840 (2006).

## Conclusiones



## CONCLUSIONES

La terapia fototérmica es una modalidad terapéutica contra enfermedades cancerígenas que se encuentra aún en etapas experimentales. La hipertermia localizada tiene especial relevancia en el tratamiento de tumores primarios y en aquellos que se encuentran en etapa temprana de desarrollo, cuando todavía no se evidencia metástasis.

En este trabajo de tesis doctoral se estudiaron los efectos fototerapéuticos y tóxicos de un nuevo nanomaterial derivado del polímero conductor **polianilina**. A partir de los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se sintetizaron nanopartículas de polímeros conjugados a base de polianilina, un polímero con propiedades semiconductoras, y polímeros anfífilicos que permitieron la estabilización estérica de las nanopartículas en medios acuosos (PVP y PNIPAM).
- Las Np-PANI 1 (estabilizadas en PVP 2%) mostraron un tamaño de 200 nm en promedio mientras que las Np-PANI 2 (estabilizadas en PVP 1% + PNIPAM 1%) mostraron un tamaño de 90 nm aproximadamente. Ambas dispersiones resultaron ser estables en medios acuosos con presencia de electrolitos y proteínas del suero sin modificarse los tamaños de las mismas.
- Ambas dispersiones de Np-PANI en solución provocaron un aumento de temperatura del medio líquido luego de la iluminación con un láser LED de 785 nm 500 mW/cm<sup>2</sup> dependiendo de la concentración de nanopartículas y del tiempo de irradiación.
- Las Np-PANI se incorporaron de manera eficiente en células LM2 a tiempos cortos (3 y 6 horas). Se demostraron distintas cinéticas de incorporación para Np-PANI 1 y Np-PANI 2, alcanzando un plateau para esta última a mayores tiempos de incubación y con mayores concentraciones intracelulares. Estas diferencias se deberían al menor tamaño de las Np-PANI 2.
- Las Np-PANI no son citotóxicas *per se* en cultivos celulares tumorales a concentraciones menores a 1,5 mg/ml y en cultivos celulares de células no tumorales a concentraciones menores a 3 mg/ml. Lo cual constituye una propiedad beneficiosa para los objetivos planteados.

- Las técnicas utilizadas para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas mostraron resultados distintos entre ellas. Estos resultados se deberían a diferentes mecanismos intracelulares ensayados como también a interferencias del nanomaterial con los compuestos utilizados en la técnica. Los resultados obtenidos a través del ensayo clonogénico, que registra todos los eventos que conducen a la muerte en forma integrada a través del tiempo, coincidieron con los obtenidos por MTT, habilitando esta técnica para evaluar los efectos de exposición a Np-PANI.
- Ambas dispersiones de nanopartículas desencadenaron la muerte celular en condiciones de irradiación *in vitro* tanto en modelos de cultivo 2D como 3D de la línea celular LM2. Los protocolos de TFT ensayados resultaron ser diferentes de acuerdo al modelo experimental empleado; con mayores tiempos de incubación (24 horas) y mayores concentraciones de nanopartículas (4 mg/ml) para el modelo de esferoides (3D).
- Las Np-PANI 1 resultaron ser más eficientes que las Np-PANI 2 en lograr la muerte celular por TFT a iguales tiempos de incubación y dosis de luz. Mediante el análisis morfológico de las células LM2 se pudo determinar muerte celular por necrosis y apoptosis.
- Las Np-PANI *per se* no lograron producir estrés oxidativo en cultivos celulares *in vitro*. Mientras que si se desencadenó la producción de ROS debido a la combinación de la radiación NIR empleando estas nanopartículas.
- La TFT con Np-PANI produciría un incremento de la temperatura significativo como también el aumento de ROS. Ambos procesos serían los responsables de provocar la muerte celular por necrosis como por apoptosis.
- A través de AMPHITOX, un modelo *in vivo* utilizado para evaluar la toxicidad de xenobióticos, se determinó una CL<sub>50</sub> de 1,5 mg/ml para Np-PANI 1 y de 1,17 mg/ml para Np-PANI 2. De acuerdo a éstas CL<sub>50</sub> se considerarían a las Np-PANI no tóxicas para organismos acuáticos.
- Ambas dispersiones de Np-PANI produjeron efectos subletales (malformaciones) en embriones de *R. arenarum*. Las diferencias encontradas entre ambas dispersiones se debieron al polímero dispersante PVP 2% utilizado en la síntesis de las Np-PANI 1.

Estos efectos subletales disminuyeron utilizando como dispersante a la combinación de los polímeros (PVP 1% + PNIPAM 1%) en la síntesis de las Np-PANI 2.

- Se determinó una mayor incorporación de Np-PANI 2 en comparación con Np-PANI 1 en larvas S.25. Esta diferencia podría ser atribuida al menor tamaño de las partículas con la consiguiente mayor acumulación. Estos resultados se correspondieron con los obtenidos en cultivos celulares.
- Se pudo determinar la localización de Np-PANI en órganos del tracto digestivo de larvas de *R. arenarum*, comprobándose mediante ensayos histopatológicos, que la principal vía de ingreso es la digestiva y que la vía de ingreso cutánea no estaría involucrada.
- En un modelo *in vivo* empleando ratones Balb/c, con tumores implantados de la línea celular LM2, se logró la ablación tumoral por TFT con las Np-PANI 1 inyectadas IT y una dosis de luz equivalente a la empleada en los ensayos *in vitro*.
- En estos ratones se evidenció una regresión total en un 60 % de los tumores y no ocurrieron recidivas de los tumores primarios y/o metástasis por un lapso de más de 3 meses de seguimiento de los animales. El estado general de estos ratones fue óptimo durante todo el periodo del ensayo.
- Se pudo determinar muerte celular por apoptosis y necrosis en los tumores luego de la TFT con Np-PANI mediante ensayos histopatológicos.
- Por último, no se observaron efectos tóxicos en ratones Balb/c luego de la TFT evaluando órganos claves en la destoxicación de compuestos y de posible impacto de nanomateriales.

