



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

# Grao en Bioloxía

## Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Análise preliminar do potencial biomédico de receptores  
macrocíclicos orgánicos con resposta a estímulos I**

**Análisis preliminar del potencial biomédico de receptores  
macrocíclicos orgánicos con respuesta a estímulos I**

**Preliminary screening of stimuli-responsive organic macrocyclic  
receptors for biomedical applications I**

**Mauro Díaz Abellás**

**Curso: 2020 - 2021.**

**Convocatoria: Setembro**

*Directores: Ana Rey Rico  
Andrés Martínez Lage*



## TRABALLO DE FIN DE GRADO

D.<sup>a</sup> Ana Rey Rico e D. Andrés Martínez Lage autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Análise preliminar do potencial biomédico de receptores macrocíclicos orgánicos con resposta a estímulos I” presentado por Mauro Díaz Abellás para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

A handwritten signature in black ink on a light beige background. The signature reads "Ana Rey" in a cursive style, with a long horizontal stroke extending to the right from the end of the word "Rey".

Asdo: Ana Rey Rico

A handwritten signature in blue ink on a light beige background. The signature is highly stylized and cursive, appearing to read "Andrés" followed by a complex flourish.

Asdo: Andrés Martínez Lage

## **AGRADECEMENTOS**

En primeiro lugar, quixera comezar agradecendo aos meus directores, a Dra. Ana Rey Rico e o Dr. Andrés Martínez Lage, por posibilitarme traballar nun proxecto tan interesante, e por guiarme e axudarme no desenvolvemento deste traballo. Ademais, tamén agradecer ao Dr. Marcos D. García Romero por aportar un punto de vista máis químico neste traballo. A Natalia por toda a súa axuda no laboratorio.

Por outro lado, quero agradecer á miña familia por todo o seu apoio ao longo da miña vida académica. Aos meus pais e aos meus avós, por ser un exemplo para min e polo seu amor incondicional. A Antía por estar sempre nos bos e malos momentos, e por toda a axuda e cariño durante esta etapa da miña vida.

Por último, quero dar as grazas as miñas compañeiras e compañeiros por todo o vivido nestes 6 longos anos de carreira.

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Abs	Absorbancia
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Ácido bicincóninico)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Seroalbúmina bovina)
CN	Control negativo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
INT	<i>Iodo-Nitro-Tetrazolium salt [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride]</i>
$\lambda$	Longitud de onda
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
LDH	Lactato deshidrogenasa
NAD <sup>+</sup> /NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (Nicotinamida adenina dinucleótido)
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> (Medio esencial mínimo)
P/E	Penicilina/Estreptomicina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
RB	<i>red box</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación estándar)
SFB	Suero Fetal Bovino
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoroacético)
WST-1	<i>Water-Soluble-Tetrazolium salt [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt]</i>

## RESUMO

A síntese de novos receptores moleculares no eido da química supramolecular experimentou un gran auxe nos últimos anos debido ás súas potenciais aplicacións biolóxicas. En especial, os sistemas receptor-substrato presentan unha serie de características interesantes para a súa aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos, que van dende a súa capacidade de autoensamblaxe ata a resposta a estímulos. Sen embargo, para o seu uso en biomedicina é necesario que amosen unha boa biocompatibilidade. Trala síntese do ciclofano tetracatiónico *red box* – derivado do coñecido *blue box* – e os bos resultados obtidos no estudo de complexos de inclusión, prevese un elevado potencial no campo biomédico para este receptor. Neste traballo, como unha aproximación inicial ás posibles aplicacións da *red box*, levouse a cabo unha avaliación da súa biocompatibilidade en dúas liñas celulares – unha normal e unha tumoral –, e estimouse de xeito indirecto a cantidade internalizada mediante medidas de absorbancia. Os resultados obtidos amosaron que o macrociclo presenta unha toxicidade relativamente baixa en ambas liñas, cunha maior sensibilidade na liña non tumoral.

## PALABRAS CHAVE

Sistemas de liberación controlada de fármacos, química supramolecular, química receptor-substrato, macrociclo, *red box*, biocompatibilidade, viabilidade celular, citotoxicidade, transporte intracelular

## RESUMEN

La síntesis de nuevos receptores moleculares en el campo de la química supramolecular ha experimentado un gran auge en los últimos años debido a sus potenciales aplicaciones biológicas. En particular, los sistemas receptor-sustrato presentan una serie de características interesantes para su aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos, que van desde su capacidad de autoensamblaje hasta la respuesta a estímulos. Sin embargo, para su uso en biomedicina es necesario que muestren una buena biocompatibilidad. Tras la síntesis del ciclofano tetracatiónico *red box*- derivada de la conocida *blue box* - y los buenos resultados obtenidos en el estudio de los complejos de inclusión, se prevé un alto potencial en el campo biomédico para este receptor. En este trabajo, como aproximación inicial a las posibles aplicaciones de la *red box* , se realizó una evaluación de su biocompatibilidad en dos líneas celulares, una normal y una tumoral, y se estimó indirectamente la cantidad internalizada mediante medidas de absorbancia. Los resultados obtenidos mostraron que el macrociclo presenta una toxicidad relativamente baja en ambas líneas, con una mayor sensibilidad en la línea no tumoral.

## PALABRAS CLAVE

Sistemas de liberación controlada de fármacos, química supramolecular, química receptor-sustrato, macrociclo, , biocompatibilidad, viabilidad celular, citotoxicidad, transporte intracelular.

## **ABSTRACT**

The synthesis of new molecular receptors in the field of supramolecular chemistry has experienced a great boom in recent years due to their potential biological applications. In particular, host-guest systems present a number of interesting features for their application in controlled drug delivery systems, ranging from their self-assembly capacity to their stimuli responsiveness. However, for their use in biomedicine it is necessary that they show good biocompatibility. After the synthesis of the tetracationic cyclophane *red box* - derived from the well-known *blue box* - and the good results obtained in the study of inclusion complexes, a high potential in the biomedical field is foreseen for this receptor. In this work, as an initial approach to the possible applications of the *red box*, an evaluation of its biocompatibility was carried out in two cell lines, one normal and one tumor, and the amount internalized was indirectly estimated by absorbance measurements. The results obtained showed that the macrocycle exhibits a relatively low toxicity in both lines, with a higher sensitivity in the non-tumor line.

## **KEY WORDS**

Controlled drug delivery systems, supramolecular chemistry, host-guest chemistry, macrocycle, *red box*, biocompatibility, cell viability, cytotoxicity, intracellular transport.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistemas de liberación controlada de fármacos.....	1
1.2. O ciclofano <i>red box</i> e os seus antecesores.....	2
1.3. Estudos de biocompatibilidade.....	3
OBXECTIVOS.....	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
2.1. Cultivos celulares.....	4
2.1.1. Liñas celulares.....	4
2.1.2. Desconxelación das células, mantemento dos cultivos e pase celular.....	4
2.2. Estudo da citocompatibilidade.....	6
2.2.1. Preparación do macrociclo <i>red box</i> .....	6
2.2.2. Sementeira en placas multipozo.....	6
2.3. Ensaio de citocompatibilidade.....	7
2.3.1. Principio dos ensaios.....	7
2.3.1.1. Ensaio WST-1.....	7
2.3.1.2. Ensaio LDH.....	8
2.3.2. Incubación co composto químico.....	8
2.3.3. Procedementos experimentais para a avaliación da viabilidade celular.....	9
2.4. Determinación do contido en proteínas de lisados celulares.....	10
2.4.1. Obtención dos lisados celulares.....	11
2.4.2. Principio e procedemento do ensaio <i>BCA</i> .....	11
2.5. Determinación espectrofotométrica da cantidade de <i>red box</i> no medio extracelular.....	12
2.6. Análise de datos.....	13
3. RESULTADOS.....	13
3.1. Estado das células tras a incubación cos compostos.....	13
3.2. Ensaio de citocompatibilidade.....	14
3.2.1. Resultados cualitativos.....	14
3.2.2. Resultados cuantitativos.....	14
3.3. Determinación da cantidade de <i>red box</i> internalizada.....	17
4. DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	22
ANEXOS.....	25

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sistemas de liberación controlada de fármacos

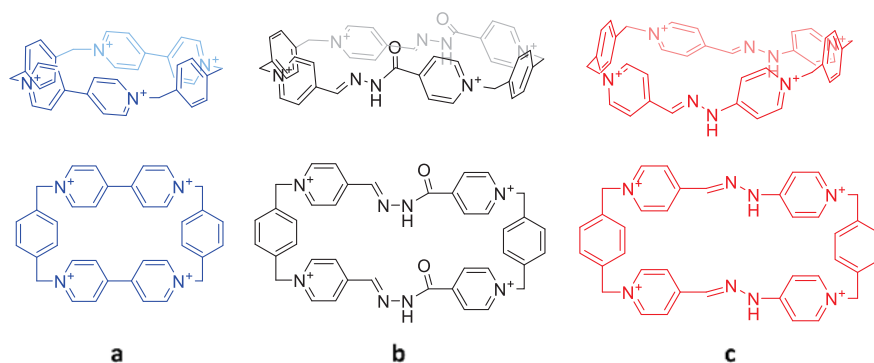
O desenvolvemento de medicamentos efectivos e seguros representa na actualidade un dos retos máis importantes no tratamento de numerosas enfermidades. Sen embargo, a pesar dos considerables esforzos na investigación de novos fármacos, moitos destes non chegan a ser adecuados para o uso clínico, debido a distintos motivos entre os que se inclúen a falta de eficacia terapéutica e una seguridade inaceptable (Fogel, 2018). Por exemplo, os efectos secundarios debido a unha actividade fóra da diana terapéutica, ou a presenza de comorbilidades, limitan a miúdo a dose de fármaco que pode ser administrada, e polo tanto reducen a eficacia dos tratamentos. Debido a isto, cobrou unha especial importancia o desenvolvemento de sistemas de liberación de fármacos, que permitan que entidades activas terapéuticamente se poidan converter en medicamentos de uso clínico (Braegelman & Webber, 2019). Deste xeito, a vectorización de fármacos defínense como un método de transporte dun composto farmacéutico ata o seu lugar específico de acción para conseguir un efecto terapéutico en animais ou humanos (Tiwari *et al.*, 2012). Neste sentido, os avances no eido da química supramolecular permitiron a obtención de numerosas moléculas con capacidade de complexación (receptores), que forman sistemas receptor-substrato con potenciais usos no eido da biomedicina (Braegelman & Webber, 2019) como por exemplo incrementar a solubilidade e a permeabilidade dun fármaco (Yudin, 2014). Algúns destes sistemas presentan a capacidade de responder a estímulos externos que poden ser indicadores fisiolóxicos de enfermidades, como por exemplo cambios no pH ou no potencial rédox. Ante este tipo de estímulos, prodúcense cambios conformacionais, configuracionais ou translacionais reversibles no receptor, que actúa como un interruptor molecular, o que permiten a liberación do fármaco (Tatum *et al.*, 2014). Ademais, tamén é posible reducir a toxicidade dun fármaco ao introducir estruturas no receptor – por exemplo péptidos ou ácidos nucleicos – que permitan o recoñecemento e a dirección controlada cara o sitio específico de acción (J. Zhang & Ma, 2013). Os sistemas de liberación de fármacos mediante liposomas, ciclodextrinas, xeles ou microesferas empréganse, por exemplo, para administrar medicamentos por vía oral e reducir os problemas derivados do pH estomacal e da degradación enzimática no tracto gastrointestinal (Tiwari *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos incrementouse considerablemente a investigación de materias con capacidade de resposta ao pH para ser empregados en sistemas de liberación de fármacos. Varios grupos funcionais, por exemplo acetais, aminas, ortoésteres ou hidrazonas, emprégáronse para obter receptores capaces de liberar o seu substrato nas condicións de pH ácido dos sitios de infección ou nas células tumorais (Sonawane *et al.*, 2017). As supramoléculas que presentan enlaces covalentes dinámicos grazas a estes grupos funcionais posúen unhas características de especial interese no eido da bioloxía, como son a capacidade de autoensamblaxe e a resposta a estímulos físico-químicos. Grazas a isto son capaces de adaptarse aos cambios no medio e aos ambientes biolóxicos (Ma & Zhao, 2014). En especial, as hidrazonas ( $R_1R_2=NNHR_3$ ) son un dos grupos máis empregados e estudados en sistemas receptor-substrato debido a que son compostos estables, con elevada diversidade funcional e propiedades farmacolóxicas de interese como por exemplo antimicrobianas, antifúnxicas, anticancerixenas, analxésicas, etc. (Verma *et al.*, 2014). Ademais, posúen unha reactividade análoga ás iminas pero sendo máis estables ante a hidrólise. A presenza do enlace imina permiten a isomerización mediada por luz ou por pH, posto que o hidróxeno en  $\alpha$  das hidrazonas é máis ácido ca no caso das cetonas (Tatum *et al.*, 2014).

## 1.2. O ciclofano *red box* e os seus antecesores.

Un dos tipos de receptores macrocíclicos máis estudados para sistemas de liberación de fármacos son os ciclofanos, que inclúen a calquera molécula cíclica formada por aneis aromáticos unidos mediante átomos ou cadeas alifáticas (Ariga & Kunitake, 2006). Moitas destas moléculas teñen a capacidade de formar complexos con diversos substratos aromáticos, o que permite o seu uso como análogos de receptores e enzimas (Sutherland, 1983). Sen embargo, a súa actividade biolóxica aínda non é ben coñecida, e está en proceso de investigación (P. Zhang *et al.*, 2012).

Dentro do grupo dos ciclofanos tetracatiónicos, o ciclobis(paraquat – *p* – fenileno), comunmente coñecido como *blue box*, é o máis empregado, especialmente no campo do desenvolvemento de máquinas moleculares (Hopf & Gleiter, 2004). Esta molécula consiste nunha estrutura rectangular formada por dúas subunidades  $\pi$ -deficientes 4, 4' - bipiridinio (lados longos), conectadas en ambos extremos a través de dúas unidades *p* – xileno (lados curtos). Esta estrutura delimita unha cavidade hidrofóbica e ríxida capaz de formar complexos con diversos substratos aromáticos  $\pi$ -excedentes (Barnes *et al.*, 2013) (*Figura 1a*). Grazas a estas propiedades, a *blue box* converteuse nun excelente receptor, tanto en medio acuoso como orgánico, de substratos bioactivos como neurotransmisores, aminoácidos aromáticos, fenilglucopiranosídeos, etc. (Asawaka *et al.*, 1996)



**Figura 1:** Estruturas 2D e 3D dos macrociclos *blue box* (a), *white box* (b) e *red box* (c) (elaboración propia).

Ante as potenciais aplicacións da *blue box*, e debido aos baixos rendementos e procesos longos que supón a súa produción, comezou a investigarse a síntese de ciclofanos con propiedades análogas na procura de obter mellores eficiencias e menores tempos de reacción. Un exemplo destes novos receptores que se lograron sintetizar é o análogo acil hidrazona, coñecido como *white box* (*Figura 1b*) (Blanco-Gómez, Fernández-Blanco, *et al.*, 2019); e máis adiante, na busca dunha mellor capacidade de complexación e de resposta a estímulos, conseguiuase sintetizar un análogo hidrazona, a *red box* (*Figura 1c*). Este último ciclofano amosou unha marcada resposta ao pH e unha gran estabilidade hidrolítica. Ao igual ca no caso da *white box*, a *red box* posúe unha cavidade interna hidrofóbica, pero máis compacta; e tamén amosa un mellor carácter  $\pi$  – aceptor. Estas características permitenlle formar, de xeito máis eficiente, complexos de inclusión con diversos substratos aromáticos mediante interaccións  $\pi$  –  $\pi$ , C – H  $\cdots$   $\pi$  e, sobre todo, forzas hidrofóbicas. Así, lograronse obter complexos de inclusión cos substratos aromáticos pireno, carbazol e 1,5 – dihidroxinaftaleno tanto en medio acuoso como en medio orgánico (Blanco-Gómez, Neira, *et al.*, 2019).

Na parte experimental do Traballo de fin de Grao de Química, coordinado co presente traballo, sintetizouse e purificouse o macrociclo *red box*, e tamén se realizou un estudo de complexos de inclusión con naproxeno e 8- metoxipsoraleno. Á vista das potenciais

aplicacións que amosa ter este macrociclo, neste traballo preténdese avaliar a súa citocompatibilidade e realizar un estudo preliminar da cinética de internalización.

### 1.3. Estudos de biocompatibilidade

Ante a potencial aplicación deste tipo de compostos no campo da biomedicina, por exemplo como sistemas de liberación de fármacos, é imprescindible levar a cabo estudos de biocompatibilidade antes do seu uso en sistemas biolóxicos. O termo biocompatibilidade refírese á capacidade dun material de funcionar cunha resposta adecuada do hóspede nunha situación específica. Esta definición implica que o material ten que cumprir unha función no tecido, que a resposta que provoque ten que ser adecuada para a súa aplicación e que a natureza desta pode variar dunha situación a outra (Williams, 2008). Idealmente, para o seu uso biomédico, o composto tería que ser non tóxico, non inmunoxénico e biodegradable. No caso de que se empregara como portador dun produto de interese ou dun fármaco, tamén tería que ter unha gran capacidade de transporte, ser selectivo e permitir o control da taxa de liberación no destino. Ademais, debería ter unhas propiedades fisicoquímicas adecuadas que lle confiran estabilidade nos tecidos e fluídos biolóxicos (Jurak *et al.*, 2021).

Como aproximación inicial para a avaliación da biocompatibilidade dun material pódese estudar a citotoxicidade. No caso dos cultivos *in vitro* considérase que un composto é citotóxico se altera gravemente á morfoloxía da célula, afecta negativamente aos ratios de crecemento ou provoca directamente a morte celular (Niles *et al.*, 2008). Para estimar a viabilidade celular realízanse ensaios nos que se mide unha actividade metabólica ou enzimática que é proporcional ao número de células viables. Habitualmente, para medir esa actividade empréganse biomarcadores como o ATP ou o potencial redutor mitocondrial. Durante períodos cortos de incubación (8 h ou menos) unha redución ou cese da actividade destes marcadores con respecto ao control, é indicativo dunha elevada citotoxicidade por danos na membrana. En períodos longos de incubación (24 h ou máis) unha redución na actividade destes marcadores indica unha diminución da taxa de división celular normal, ou a morte celular por mecanismos programados como a apoptosis. Ademais, os ensaios de viabilidade celular miden o número relativo de células que permanecen tralo tratamento, o que permite levar a cabo ensaios incluso durante períodos longos de tempo (72 h por exemplo) (Niles *et al.*, 2009). Entre os métodos que permiten estimar a viabilidade celular destacan a redución de sales de tetrazolio (por exemplo nos ensaios WST ou MTT), a redución da resazurina e a medición de ATP (Riss *et al.*, 2016).

Por outro lado, nos ensaios de citotoxicidade os biomarcadores máis empregados son enzimas con secuencias ben conservadas e relativamente estables, que son liberadas ao medio extracelular tras unha perda da integridade da membrana. Sen embargo, estas enzimas teñen un tempo de vida limitado o que limita o uso destes ensaios en períodos longos de incubación co composto (Niles *et al.*, 2009). Entre os ensaios de citotoxicidade máis empregados destacan o ensaio LDH e tamén a medición de proteasas (Adan *et al.*, 2016) (Niles *et al.*, 2009). Na actualidade, para levar a cabo a avaliación biolóxica e clínica de materiais médicos tómanse como referencia as normativas ISO, que son estándares internacionais desenvolvidos por expertos de ata 165 países, que se aseguran de garantir a calidade e seguridade de produtos para os consumidores (International Organization for Standardization, 2021). Neste traballo tomouse como referencia a normativa ISO para a avaliación biolóxica de dispositivos médicos (International Standard ISO 10993-5 2009) para determinar a citotoxicidade do macrociclo *red box*.

## OBXECTIVOS

Ante as prometedoras aplicacións no campo da biomedicina do macrociclo *red box*, neste traballo planeouse avaliar a súa biocompatibilidade en dúas liñas celulares, unha tumoral (HeLa) e outra non tumoral (HFF-1). En concreto, os obxectivos específicos do presente traballo foron:

1. Realizar un *screening* preliminar da citotoxicidade de diferentes concentracións (0.05, 1, 5, 10, 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) da *red box* nas liñas celulares normais e tumorais.
2. Estudar a viabilidade das liñas celulares ó longo do tempo en presenza das concentracións máis elevadas (20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) do composto.
3. Facer un estudo preliminar da cantidade de macrociclo internalizada nas células tumorais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Cultivos celulares

#### 2.1.1. Liñas celulares

Para os ensaios levados a cabo co macrociclo *red box* empregáronse dúas liñas celulares, unha non tumoral e outra tumoral. A primeira trátase dunha liña HFF-1, obtida a partir de fibroblastos de prepucio dun varón neonato (*HFF-1 ATTC® SCRC-1041™*). A segunda é unha liña de células epiteliais HeLa, obtida dun adenocarcinoma de cervix dunha muller de raza negra de 31 anos (*HeLa ATTC® CCL.2™*). Ambas liñas celulares conserváronse en crioviais contendo DMSO en nitróxeno líquido ata o momento de realizar os cultivos para os ensaios.

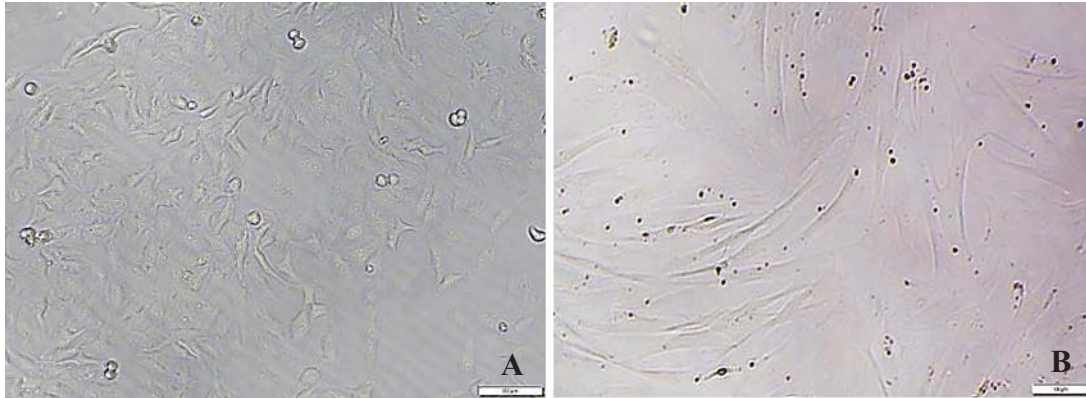
#### 2.1.2. Desconxelación das células, mantemento dos cultivos e pase celular

Os procedementos descritos a continuación, que implicaron o manexo das liñas celulares, leváronse a cabo nunha cabina de seguridade biolóxica tipo 2 (*Telstar BIO-II-Advance*, España), e usando material estéril para evitar a contaminación dos cultivos. O medio de cultivo empregado consistiu en medio esencial mínimo (MEM; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU), suplementado cun 10 % de soro fetal bovino (SFB, *Gibco-ThermoFisher Scientific*, Sudamérica) e un 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/E; *Sigma-Aldrich*, EE. UU) (medio completo). Para os lavados empregouse tampón fosfato salino (PBS; *Sigma-Aldrich*, EE. UU). Estes medios conserváronse en neveira e atemperáronse nun baño termostatizado a 37 °C antes do seu uso.

Para desconxelar cada liña celular, suspendéronse as células contidas no criovial en 10 mL de medio de cultivo nun tubo Falcon de 15 mL. A continuación, centrifugáronse durante 5 minutos a 1500 rpm, e a temperatura ambiente, nunha centrífuga *Eppendorf 5340R*. Tras eliminar o sobrenadante resuspendeuse o *pellet* de células en 5 mL de medio completo. Finalmente, transvasouse a suspensión celular a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con tapón ventilado *Nunc™ EasYFlask™* (*ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) e engadiuse medio completo ata un volume final de 15 mL. Os frascos de cultivo incubáronse nun incubador *Fisherbrand* de atmosfera húmida, a 37 °C e cun 5 % de CO<sub>2</sub>.

Na *Figuras 2* amósanse fotografías ao microscopio óptico (microscopio óptico invertido *Olympus CKX53*, España) das dúas liñas celulares empregadas, onde se pode observar o seu tamaño e a súa morfoloxía.





**Figura 2:** Fotografía ao microscopio óptico (10X; barra=100µm) das liña HFF-1 (A) e HeLa (B) tras a desconxelación e sementeira en frasco

Unha vez preparados os cultivos celulares de ambas liñas foi necesario levar a cabo un seguimento dos mesmos, e realizar cambios de medio e pases celulares, ata ser empregadas nos ensaios realizados. Este seguimento é necesario para manter unha confluencia adecuada para os ensaios, así como para detectar posibles contaminacións e manter as condicións axeitadas para o crecemento das células. Para a medida de todos os volumes necesarios empregáronse pipetas serolóxicas estériles con pipeteador automático, ou micropipetas automáticas, manexadas coa precaución de non danar a monocapa de células e evitando a contaminación cruzada.

Para levar a cabo os cambios de medio, realizouse un lavado con 10 mL de PBS, despois de retirar o medio de cultivo, para eliminar as células que non estivesen adheridas, e engadíronse 12 mL de medio completo.

Cando os cultivos acadaron unha confluencia do 80-90 % - comprobada mediante a observación ao microscopio – procedeuse a realizar pases celulares. En primeiro lugar retirouse o medio e levouse a cabo un lavado con 10 mL de PBS. A continuación, engadíronse 5 mL de tripsina-EDTA 1X (*MP Biomedicals™*, España), e incubouse o frasco a 37 °C durante 5 minutos, co fin de despegar a monocapa de células. Tras ese tempo, confirmouse a separación das células ao microscopio, engadíronse 10 mL de medio de cultivo, para inactivar a enzima, e a suspensión celular resultante centrifugouse a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación, levouse a cabo un recuento celular utilizando unha cámara de contaxe de Neubauer Cellgro™ (*Fischer Scientific*, España) cargando 10 µL, na zona superior e inferior da cámara, dunha mestura 1:1 de colorante azul tripán ca suspensión celular. Este axente de tintura permite diferenciar as células con algún dano na membrana plasmática, que son capaces de captar o colorante e tinguirse de azul, das células viables que non se teñen. Desta forma, na cuadrícula 3 x 3 de cada zona, contáronse as células dos cuadrantes das esquinas excluíndo as células que se atopaban nos límites cos cuadrantes centrais. A continuación, realizouse unha media do recuento de ambas zonas, e calculouse a concentración de células na suspensión (células/mL), tendo en conta o número de cuadrantes (4), o factor de dilución  $n$  (2), e o volume de cada cuadrante:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{N^{\circ} \text{ células por cuadrante}}{4} \cdot 2^n \cdot \frac{1}{10^{-4} \text{ mL}} \quad (1)$$

Unha vez obtida a concentración da suspensión celular, calculouse o volume que se necesita para sementar 250.000 células en dous novos frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Unha vez

engadido o volume necesario nos frascos, engadiuse medio completo ata un volume final de 12 mL.

## 2.2. Estudo da citocompatibilidade

### 2.2.1. Preparación do macrociclo *red box*

O ciclofano *red box* (RB-4TFA) foi sintetizado e purificado como parte do traballo de fin de grao de Química coordinado co presente traballo. Obtívose un sólido amarelo claro con TFA (ácido trifluoroacético) de contraíón, a partir do cal se preparou unha disolución *naí* 1mM en PBS, nun matraz aforado de 10 mL.

Para os ensaios de citocompatibilidade probáronse un total de 7 concentracións diferentes: 0,05, 1, 5, 10, 20, 50 e 100  $\mu$ M. Tendo en conta isto, preparáronse disolucións *stock* dez veces máis concentradas – mediante dilucións seriadas a partir da disolución 1 mM – en tubos de microcentrífuga de 2 mL, para que ao ser diluídas co medio celular se obtivese a concentración desexada no ensaio (*Figura 3*).



**Figura 3:** Disolucións de RB-4 TFA en PBS de concentracións 1000, 500, 200, 100, 50, 10 e 0,5  $\mu$ M (de esquerda a dereita).

### 2.2.2. Sementeira en placas multipozo.

Para levar a cabo os ensaios de citocompatibilidade e de cinética de internalización, foi necesario sementar células en placas adherentes de 96 e 24 pozos, respectivamente, Corning™ (*Fisher Scientific*, España). A sementeira realizouse 24 horas antes da adición do composto, e seguindo o mesmo procedemento ca no caso dos pases celulares (3.2.1. *Desconxelación das células, mantemento dos cultivos e pase celular*). Unha vez obtida a suspensión celular en 10 mL de medio completo, determinouse a concentración celular mediante un recuento en cámara Neubauer Cellgro™ (*Fisher Scientific*, España). No caso das placas de 96 pozos buscouse ter 10.000 células en cada pozo nun volume de 100  $\mu$ L de medio polo que se prepararon 10 mL dunha suspensión celular con 100.000 células/mL para o número de pozos sementados. No caso das placas de 24 pozos buscouse ter unha concentración de aproximadamente 50.000 células nun volume final de 1 mL, polo que foi necesario preparar 25 mL dunha concentración de 50.000 células/mL para sementar a totalidade da placa.

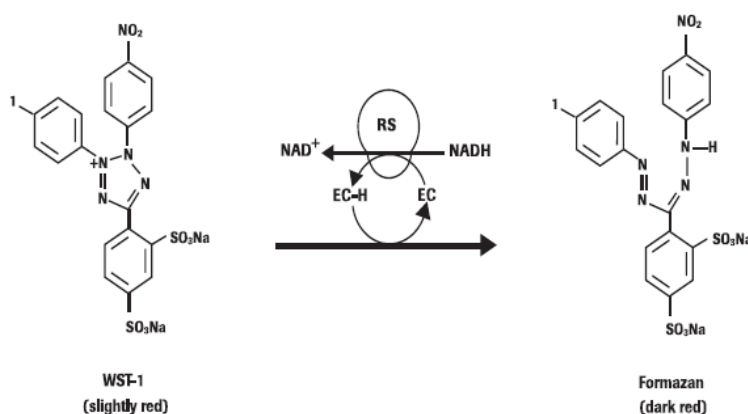
## 2.3. Ensaio de citocompatibilidade

### 2.3.1. Principio dos ensaios

Para o estudo da citotoxicidade da *red box* realizáronse dous ensaios colorimétricos de cuantificación espectrofotométrica. Ambos ensaios están baseados na redución de sales de tetrazolio para obter o seu equivalente formazán, que pode ser cuantificado mediante medidas espectrofotométricas. Os ensaios que se levaron a cabo chámanse WST-1 (*Cell Proliferation Reagent WST-1*; Roche, España) e LDH (*Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit*; ThermoFisher Scientific, EE. UU.) en referencia ao reactivo e á enzima claves na transformación. Os ensaios realizáronse en dúas liñas celulares (HFF-1 e HeLa), e en placas de 96 e 24 pozos. En primeiro lugar, avalíouse a citotoxicidade, mediante o ensaio WST-1, tras 24 h de incubación con 7 concentracións distintas da *red box*: 0,05, 1, 5, 10, 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . A continuación avalíouse a citocompatibilidade ó longo do tempo (24 e 72 horas), para as concentracións máis elevadas de composto (20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ), mediante os ensaios WST-1 e LDH.

#### 2.3.1.1. Ensaio WST-1

Neste ensaio empregouse un reactivo que contén a sal de tetrazolio WST-1 e, a maiores, un axente de acoplamento electrónico. Na superficie da célula a sal de tetrazolio vai a reducirse a formazán, de cor vermella escura, mediante un mecanismo que depende da produción intracelular de NAD(P)H – especialmente no ciclo de Krebs –, que vai a actuar como un aceptor intermedio de electróns na reacción (*Figura 4*). A cantidade de produto que se forma vai a depender da actividade das deshidroxenasas mitocondriais que catalizan a reacción e, polo tanto, do número de células viábles e metabólicamente activas. Deste xeito, valores elevados de absorbancia van a corresponderse cunha elevada viabilidade celular (Roche, 2018).



**Figura 4:** Proceso de redución de WST-1 ((4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) a formazán. [EC = *electron coupling reagent*; RS = *mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system*]. (Roche, 2018)

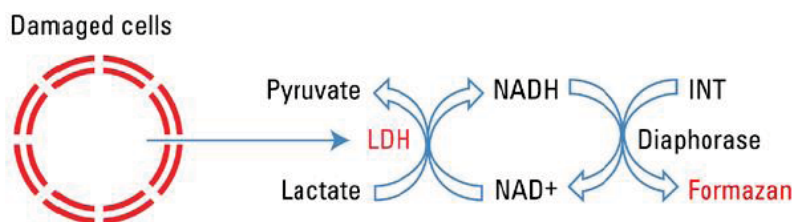
As porcentaxes de viabilidade celular (% viabilidade) foron calculadas de acordo coa ecuación (2), na que a absorbancia da mostra (Abs mostra) se corresponde cos valores de absorbancia rexistrados para cada concentración de *red box* ensaiada, e a absorbancia do control negativo Abs (control negativo) coa obtida coas células incubadas en ausencia de composto.



$$\% Viabilidade = \frac{Abs (mostra)}{Abs (control negativo)} \cdot 100 \quad (2)$$

### 2.3.1.2. Ensaio LDH

Este ensaio basease na liberación da enzima citosólica Lactato Deshidroxenasa (*LDH*) en células con danos na membrana plasmática. A LDH liberada ó medio pode ser cuantificada a través dunha reacción enzimática acoplada, na cal se forma piruvato a partir de lactato, a través da redución de  $NAD^+$  a  $NADH$ . A continuación, a enzima Diforasa emprega ese  $NADH$  para reducir a sal de tetrazolio (INT) a formazán. Deste modo, a cantidade de formazán formado é directamente proporcional á cantidade de LDH liberada e, polo tanto, os valores elevados de absorbancia son indicativos da citotoxicidade. (TermoFisher Scientific).



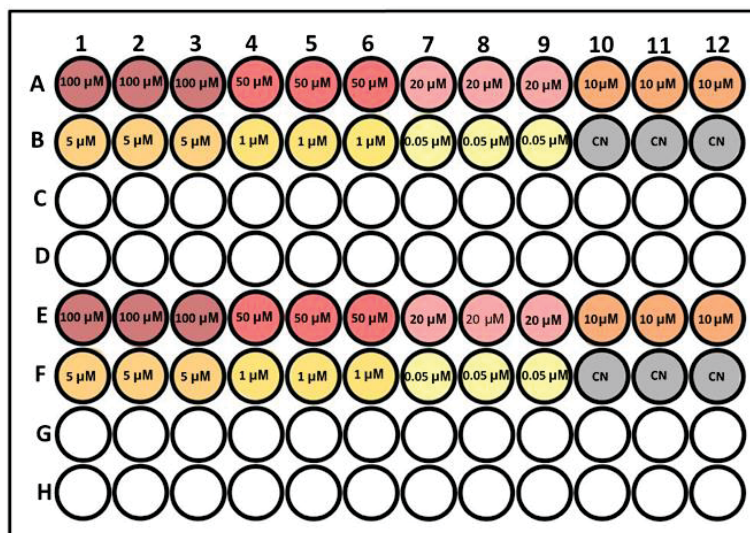
**Figura 5:** Esquema do mecanismo do ensaio de LDH, que implica a redución de INT a formazán (TermoFisher Scientific).

Para o cálculo do porcentaxe de viabilidade neste ensaio (*Ecuación 3*) é necesario realizar dous controis: un control de máxima actividade e un control de actividade espontánea. Para o primeiro control, que equivale a un control positivo de máxima liberación da enzima, as células trátanse cun tampón de lise para promover a rotura da membrana. Para o control de liberación espontánea de LDH incúbanse as células en medio ao que se lle engade PBS no mesmo volume ca os compostos.

$$\% Viabilidade = 100 - \left[ \frac{[Actividade LDH mostra - Actividade LDH espontánea]}{[Actividade LDH máxima - Actividade LDH espontánea]} \cdot 100 \right] \quad (3)$$

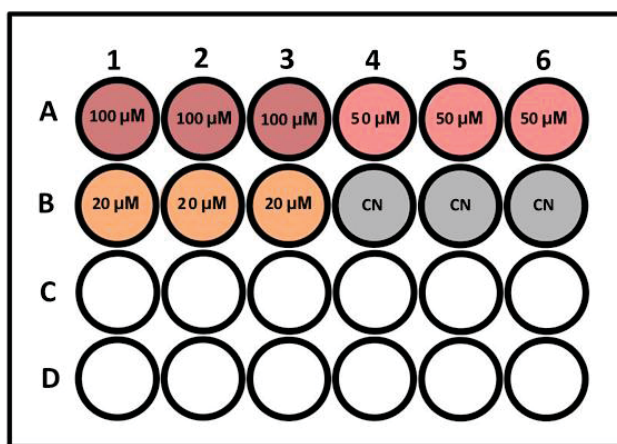
### 2.3.2. Incubación co composto químico

Tras a sementeira e incubación das células durante 24 horas nas placas multipozo, procedeuse a engadir as distintas concentracións do composto, previamente preparadas. Para o primeiro ensaio de citotoxicidade preparouse unha placa de 96 pozos con dúas liñas celulares á que engadíronse 7 concentracións distintas de composto – 0,05, 1, 5, 10, 20, 50 e 100  $\mu M$  – por triplicado e seguindo o esquema da *Figura 6*. Para a adición dos compostos, retirouse o medio de cultivo, e engadíronse 90  $\mu L$  de medio completo e 10  $\mu L$  das correspondentes disolucións *stock* da *red box*, de xeito que se obtivo unha dilución final 1/10. Tamén se prepararon uns controis negativos aos que se engadiu o mesmo volume de PBS ca de disolución de composto. Tras isto incubouse a placa a 37 °C durante 24 h ata realizar o correspondente ensaio de viabilidade.



**Figura 6:** Deseño da placa de cultivo de 96 pozos para o ensaio WST-1, no que se indican as posicións das disolucións das distintas concentracións de *red box*, así como a dos controis negativos(CN).

Tras avaliar a citocompatibilidade con estas concentracións, analizouse a viabilidade celular ó longo do tempo en presenza das 3 concentracións máis elevadas de composto (20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Para isto preparáronse dúas placas de 24 pozos, coas dúas liñas celulares no que se ensaiaron as 3 concentracións de composto e un control negativo todos eles por triplicado (*Figura 7*). As placas incubáronse a dous tempos distintos, unha a 24 e outra a 72 horas, antes de realizar dos correspondentes ensaios.



**Figura 7:** Deseño da placa de cultivo de 24 pozos para os ensaios WST-1 e LDH, no que se indican as posicións das disolucións das distintas concentracións de *red box*, así como a dos controis negativos(CN).

### 2.3.3. Procedementos experimentais para a avaliación da viabilidade celular

#### 2.3.3.1. Procedemento do ensaio WST-1

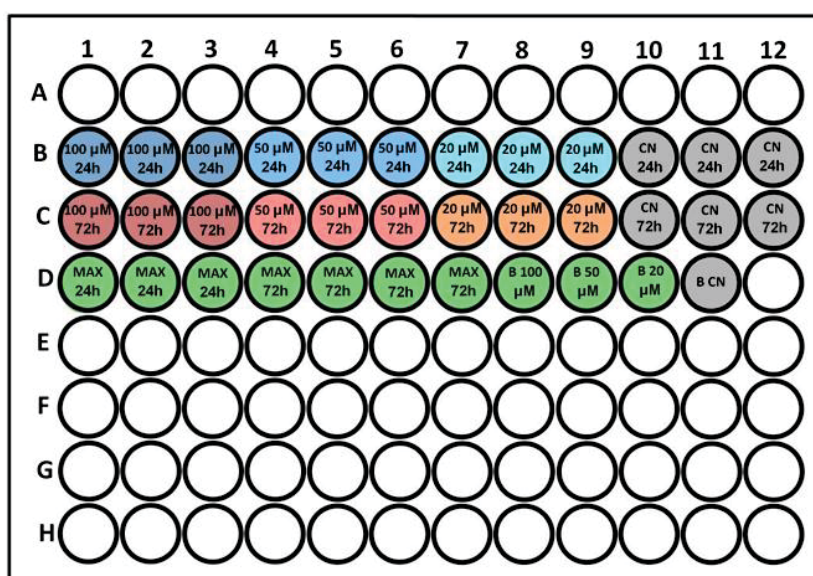
Antes de levar a cabo o ensaio comprobouse o estado das células mediante a súa observación no microscopio. Este ensaio realizouse sobre a monocapa celular, polo que foi necesario retirar o medio co composto e efectuar un lavado con medio MEM sen suplementar. A continuación, engadíronse 100  $\mu\text{L}$  dese mesmo medio e 10  $\mu\text{L}$  do reactivo WST-1 – para ter unha dilución final 1:10 – e incubáronse as células a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante un total de 2 horas. Nese intervalo de tempo realizáronse medidas de absorbancia a distintos tempos (30 min, 1 h, 1,5 h e 2 h) para seguir a evolución dos valores de absorbancia co

tempo.

A absorbancia mediuse cun lector espectrofotométrico de placas *SinergyHTX* (Biotek, EE.UU.) empregando un filtro de 450 nm. Os valores léronse e procesáronse mediante o programa informático *Gen5*.

### 2.3.3.2. Procedemento do ensaio LDH

Tras o tempo de incubación cos compostos preparáronse os controis positivos. Para isto engadíronse 30  $\mu\text{L}$  – para unha placa de 24 pozos – dun tampón de lise, nos pozos que contiñan soamente células e medio de cultivo, e a continuación incubáronse a 37 °C durante 45 minutos. O ensaio levouse a cabo sobre o medio que estivo en contacto coas células, polo que se retiraron 50  $\mu\text{L}$  de cada un dos pozos e se transferiron a unha placa de 96 pozos (Figura 8). A continuación engadíronse 50  $\mu\text{L}$  da mestura de reacción – preparada seguindo as instrucións do fabricante – e incubouse a placa a temperatura ambiente e protexida da luz durante 30 minutos. Tras ese tempo engadíronse 50  $\mu\text{L}$  dunha disolución de parada e realizouse unha lectura da absorbancia.



**Figura 8:** Deseño da placa de cultivo de 96 pozos para o ensaio LDH, no que se indican as posicións das disolucións das distintas concentracións de *red box* para os distintos tempos de incubación, así como a dos controis negativos(CN) e máximos de LDH (MAX).

As medidas da absorbancia leváronse a cabo empregando o mesmo equipo ca no caso do ensaio WST-1 e, a maiores da lectura a 450 nm, tamén se realizou unha lectura a 680 nm – que se corresponde coa absorbancia de fondo – seguindo as indicacións do fabricante.

### 2.4. Determinación do contido en proteínas de lisados celulares

Tras 24 ou 72 h de incubación co composto químico, determinouse a cantidade de proteína en cada pozo previa lise das células. Para isto usouse un kit para a determinación do contido total de proteínas, coñecido como *BCA* (ThermoFischer Scientific).

### 2.4.1. Obtención dos lisados celulares

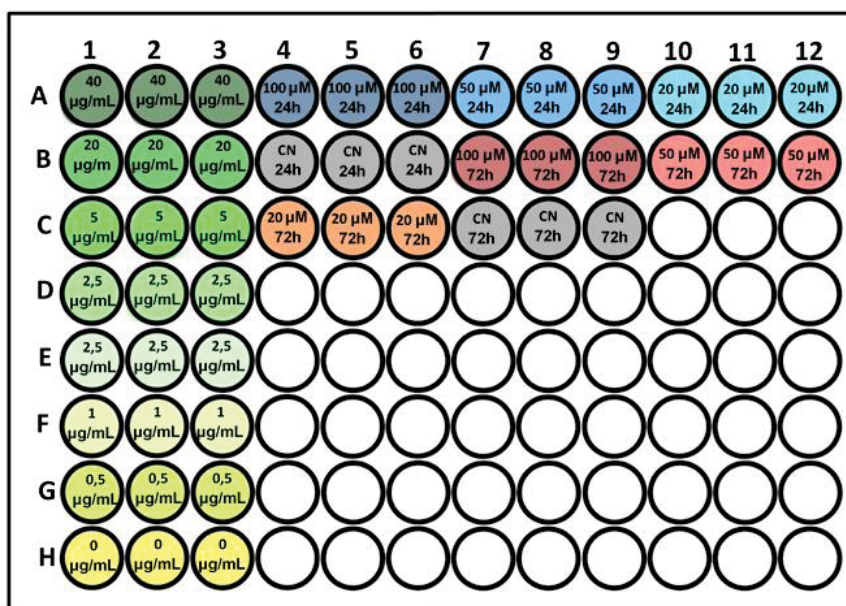
Preparáronse dúas placas de 24 pozos coa liña celular HeLa, e incubáronse coas concentracións mais altas do composto químico (20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 e 72 horas de igual xeito que para os ensaios anteriormente explicados. Unha vez pasado ese tempo, retiráronse os sobrenadantes e consérvanse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en tubos Eppendorf, para levar a cabo medidas de absorbancia do composto no medio (ver apartado seguinte). A continuación, laváronse as monocapas celulares con 1 mL de PBS e engadíronse 250  $\mu\text{L}$  dunha disolución de tampón de lise 1X (preparada a partires dunha disolución 5X comercial (Cell Culture Lysis Reagent 5X; Promega, EE. UU.). Trala adición do tampón de lise raspouse o fondo de cada un dos pozo, cunha punta de micropipeta, durante aproximadamente 3 minutos cada un, para romper as membranas celulares da monocapa. Por último, tras comprobar ao microscopio que tódalas células estaban lisadas, retirouse o volume de lisados de cada pozo, transferíronse a tubos Eppendorf, e centrifugáronse durante 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5.000 rpm para eliminar posibles restos celulares. Trala centrifugación almacenáronse os tubos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4.2. Principio e procedemento do ensaio *BCA*

Este ensaio permite a detección e cuantificación colorimétrica do contido total de proteínas. Baséase no emprego do ácido bicincónico (BCA) que dá lugar a un complexo de cor púrpura con  $\text{Cu}^{1+}$ , o cal se forma cando as proteínas reducen o  $\text{Cu}^{2+}$  nun ambiente alcalino. A cantidade de produto formado vai ser directamente proporcional ao contido de proteínas, e pode ser detectado a través de medidas de absorbancia a 562 nm.

Para levar a cabo o ensaio desconxeláronse os tubos Eppendorf coas mostras de lisado celular e preparouse unha placa de 96 pozos como a que se amosa na *Figura 11*. En cada un dos pozos engadíronse 5  $\mu\text{L}$ , da correspondente mostra de lisado, e 145  $\mu\text{L}$  de auga *miliQ*. A continuación, preparáronse unha serie de disolucións *stock* de seroalbúmina bovina (SAB) de 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para obter unha recta de calibrado. Estas disolucións se prepararon a partir dunha disolución 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que contén o kit, en tampón de lise 0.01 X, e se engadiron na placa tal e como se amosa na *Figura 11*. Despois de preparar a placa preparáronse 11 mL da mestura de reacción, que contén 25 partes do reactivo A, 24 partes do reactivo B e 1 parte do reactivo C, incluídos no kit comercial. Unha vez preparada, engadíronse 150  $\mu\text{L}$  desta mestura en cada un dos pozos e incubouse a placa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Pasado ese tempo realizáronse medidas de absorbancia a 562 nm nun lector espectofotométrico de placas *SinergyHTX* (Biotek, EE.UU.) e os valores obtidos foron procesados mediante o programa informático *Gen5*.





**Figura 9:** Deseño da placa de cultivo para o ensaio BCA, no que se indican as posicións das disolucións das distintas concentracións *stock* de SAB (columnas 1-3). Tamén se indican as posicións das disolucións de *red box*, así como as dos controis negativos(CN).

Unha vez obtidos os valores de absorbancia, representouse unha recta de calibrado cos datos das disolucións *stock*, a partir da cal se pode calcular a concentración de proteínas nas distintas mostras de lisado.

## 2.5. Determinación espectrofotométrica da cantidade de *red box* no medio extracelular

Co fin de obter unha medida indirecta da cantidade de *red box* internalizada, determinouse a absorbancia deste composto no medio de cultivo en contacto coas células HeLa.

Debido a que o macrociclo *red box* posúe dúas formas diferentes, e con distinto coeficiente de absorción, en función do pH é necesario asegurarse que no medio só se atope unha das formas para evitar interferencias. Para lograr isto, preparáronse dúas disolucións tampón (pH 4 e pH 11) coas que se levaron a cabo as dilucións das mostras de sobrenadantes para as medidas de absorbancia. En primeiro lugar preparouse unha disolución tampón 1 M de pH 4, disolvendo 2,13 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,58 g de ácido cítrico en 15 mL de auga *miliQ*. De igual xeito, para obter a disolución tampón 1 M de pH 11 disolvéronse 1,13 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,424 g de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en 10 mL de auga *miliQ*. A partir de cada unha das disolucións tampón preparouse unha disolución nai de tampón e medio completo en proporción 1:1, que foi empregada para as dilucións das mostras. As medidas de absorbancia realizáronse tanto para a forma básica como para a forma ácida e os resultados de ambas comparáronse para detectar posibles erros nas medidas.

Antes de realizar as medidas preparouse un branco para cada forma do macrociclo (un a pH 4 e outro a pH 11), que consistiu en 700 µL da respectiva disolución de tampón e medio completo 1:1. Este branco empregouse para que o equipo rexistrase unha liña base que se toma como referencia para a medida das mostras. Para levar a cabo as medidas dos sobrenadantes engadíronse na cubeta 100 µL de cada mostra e 700 µL da mestura de disolución tampón e medio completo, anteriormente preparada, para ter unha dilución final 1:8. Esta dilución foi necesaria para asegurarse de que os valores de absorbancia entrasen

no rango lineal da ley de Lambert-Beer.

As medidas lévaronse a cabo nun espectrofotómetro UV-VIS V650 (*Jasco, España*) e rexistráronse os máximos de absorbancia a 366 nm para a forma ácida e 463 nm para a forma básica. A partir destes valores calculouse a concentración do macrociclo empregando a ecuación da ley de Lambert-Beer (*Ecuación 4*):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (4)$$

onde  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinción molar en  $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , que foi obtido experimentalmente para cada unha das formas,  $l$  é o ancho da cubeta cun valor de 1 cm, e  $C$  é a concentración do composto en  $\mu\text{M}$ .

A partir dos valores de concentración no medio poden estimarse a cantidade de *red box* que se internaliza para cada concentración. Todos os valores normalízanse respecto á cantidade de proteínas totais obtida mediante o ensaio *BCA* e expresáronse coma ng *red box*/μg proteínas. As porcentaxes de internalización foron calculadas tomando coma base a concentración de composto inicialmente engadida.

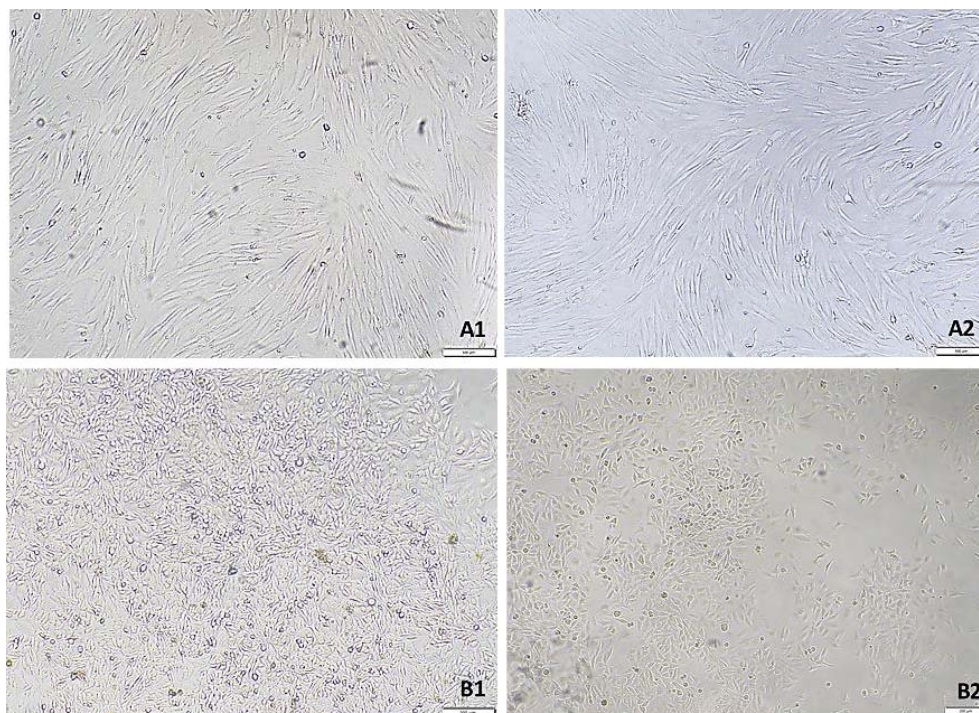
## 2.6. Análise de datos

A partir dos resultados obtidos en cada un dos ensaios, estimouse a media e a desviación estándar (SD) dos distintos grupos de réplicas, co obxectivo de expresar os resultados a través destes parámetros. Todas as condicións foron ensaiadas por triplicado e no caso do *screening* inicial da citotoxicidade do composto o ensaio foi replicado ademais en 2 experimentos independentes. Asemade, realizouse unha análise estatística co fin de detectar as diferenzas significativas entre os distintos tempos de incubación a unha mesma concentración (nos cálculos de viabilidade, na determinación da cantidade total de proteínas e na internalización da *red box*), para o que se empregou o test *t-Student* de comparación de medias, unilateral e para mostras independentes de varianzas homoxéneas, traballando a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). A presenza de datos anómalos, estimouse empregando un test de Grubs a un nivel de confianza do 95 %.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Estado das células tras a incubación cos compostos

Tras a incubación co composto químico, e antes de levar a cabo os ensaios, realizouse unha comprobación do estado das células mediante unha observación ao microscopio. Na *Figura 10* pódese observar o estado das células HeLa e HFF-1 tras 24 h en contacto cun medio de concentración 100  $\mu\text{M}$  de *red box*, e cun medio sen composto (control negativo). Aparentemente non se observou ningún cambio morfolóxico nin dano externo en ambos tipos de liñas celulares ao estar en contacto co composto. As diferenzas coas distintas concentración ensaiadas poden observarse nas *Figuras 16 e 17* no apartado *Anexos*.



**Figura 10:** Fotografías ao microscopio óptico (10X;barra=200µm) do estado dos cultivos HFF-1 (A) e HeLa (B) logo de 24 h de incubación en presenza (1) e en ausencia (2) do composto *red box* a unha concentración de 100 µM .

## 3.2. Ensaio de citocompatibilidade

### 3.2.1. Resultados cualitativos

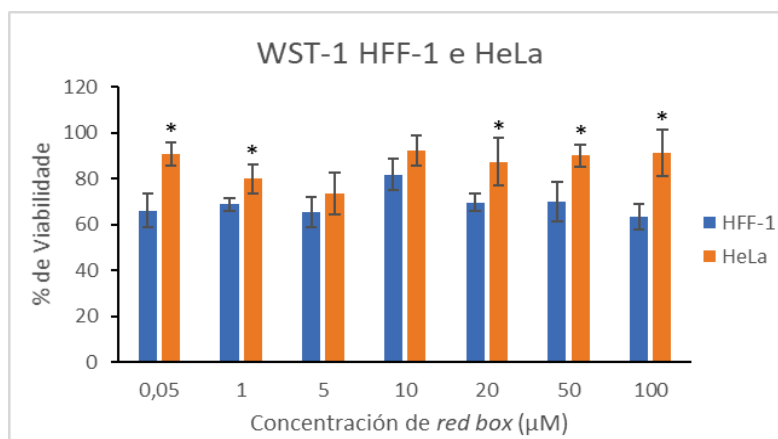
Os ensaios de citocompatibilidade levados a cabo son colorimétricos, e están baseados na formación do composto coloreado trala a adición dun reactivo (color roxo do formazán nos ensaios WST-1 e LDH) ou violeta resultante do quelato con ácido bicinconínico (ensaio BCA). Así a cantidade de produto formada relaciónase directa (WST-1 e BCA) ou indirectamente (LDH) co número de células. Deste xeito, é posible ter unha idea preliminar do efecto do composto nas células comparando o cambio de cor do medio dos pozos, antes e despois da incubación co reactivo, e tamén por contraste cos controis negativos. Nas *Figuras 18 e 19* do apartado *Anexos* amósase un exemplo para cada ensaio.

### 3.2.2. Resultados cuantitativos

#### ***Screening da citotoxicidade do macrociclo red box***

A partir dos valores de absorbancia obtidos no lector de placas, calculouse a porcentaxe de viabilidade empregando a *Ecuación 2*, para cada unha das liñas celulares (HFF-1 e HeLa) e levouse a cabo a análise estatística xa mencionada.

A *Figura 11* amosa os resultados gráficos para a liña celular HFF-1 e para a liña HeLa. Os datos numéricos correspondentes recóllense na *Táboa 1* e, os *p*-valores, na *Táboa 2*, ambas dispoñibles en *Anexos*.



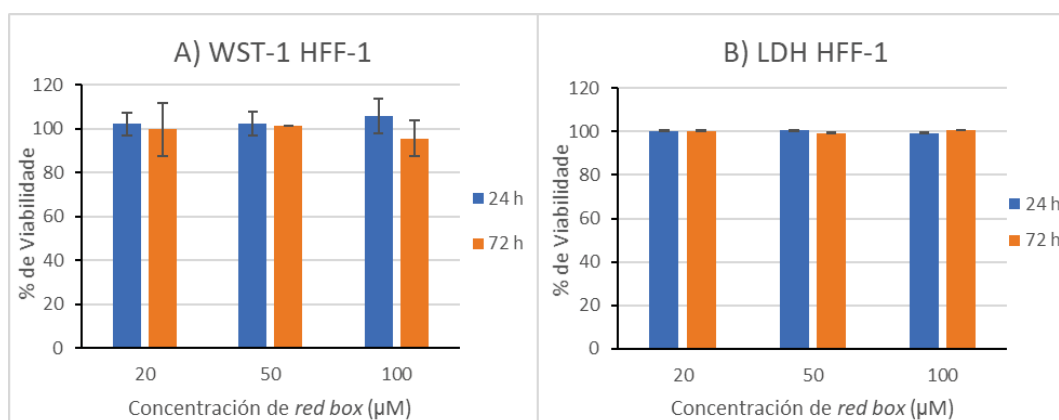
**Figura 11:** Efecto sobre a viabilidade das células HFF-1 e HeLa das distintas concentracións de *red box* tras 24 h de incubación, avaliado a través do ensaio WST-1. As barras de erro representan a desviación estándar dos replicados e \* indica a existencia de diferenzas estatisticamente significativas tras comparar a mesma concentración de composto en ambas liñas celulares ( $p < 0,05$ ).

Á vista dos resultados obtidos (*Figura 11*) observouse que os valores de viabilidade da liña HeLa foron superiores aos da liña HFF-1, con diferenzas significativas entre ambas liñas celulares ( $p < 0,05$ ), coa excepción das concentracións de 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Así, as porcentaxes de viabilidade da liña HFF-1 foron superiores ao 60 % a tódalas concentracións ensaiadas, mentres que na liña HeLa as porcentaxes calculadas estiveron en torno ao 90 %.

### **Cinética da viabilidade celular en contacto co macrociclo red box ó longo do tempo**

Para cada un dos ensaios (WST-1 ou LDH), liñas celulares (HeLa ou HFF-1) e tempo de incubación co macrociclo (24 ou 72 h), a partir dos valores de absorbancia medidos no lector de placas, e aplicando as *Ecuacións 2 e 3* xa explicadas, calculáronse as porcentaxes de viabilidade celular.

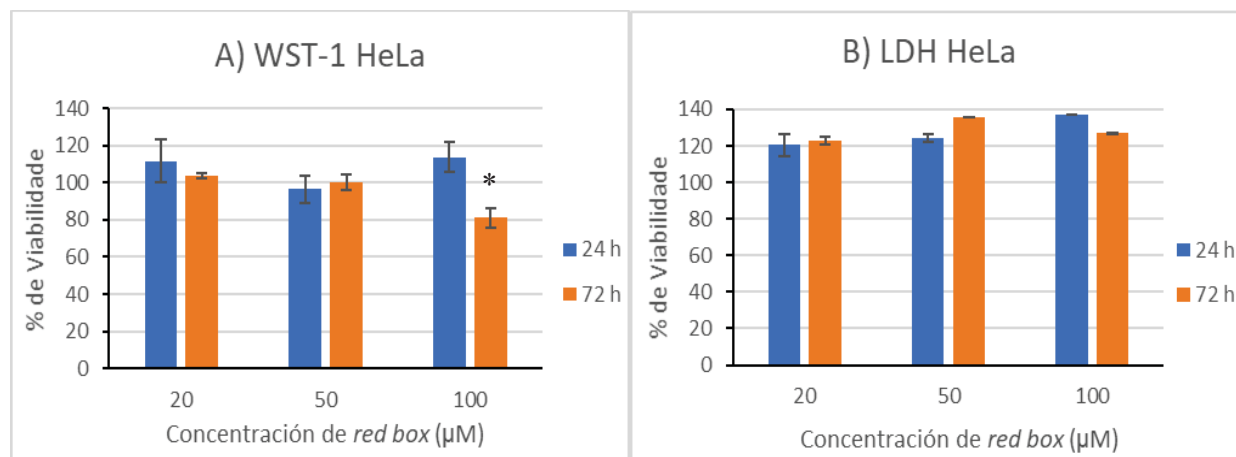
A *Figura 12* amosa as representacións gráficas dos resultados obtidos para as células HFF-1 e, a *Figura 13*, para as HeLa. Os datos numéricos correspondentes recóllense nas *Táboas 3 e 4* (HFF-1) e *6 e 7* (HeLa) e, os *p*-valores, na *Táboa 5* (HFF-1) e *8* (HeLa), todas dispoñibles en *Anexos*.



**Figura 12:** Efecto sobre a viabilidade das células HFF-1 das distintas concentracións de *red box* tras os dous tempos de incubación (24 e 72 h), avaliado a través do ensaio WST-1 (A) e LDH (B). As barras de erro representan a desviación estándar dos tres replicados e \* indica a existencia de diferenzas estatisticamente significativas tras comparar a mesma concentración de composto aos dous tempos de incubación ( $p < 0,05$ ).



Respecto á viabilidade celular da liña HFF-1, á vista dos resultados obtidos para o ensaio WST-1 (Figura 12A), non se observaron diferenzas estatisticamente significativas entre os distintos tempos de incubación para ningunha das concentracións estudadas, se ben observouse unha lixeira redución da mesma tras 72 de incubación coa maior concentración de composto. Por outro lado, no caso do ensaio LDH (Figura 12B), os valores de viabilidade atópanse en torno ao 100 % e tampouco se observaron diferenzas significativas entre os distintos tempos. Tamén cabe destacar que os datos do ensaio WST-1 presentaron unha dispersión moito maior ca no caso do ensaio LDH.



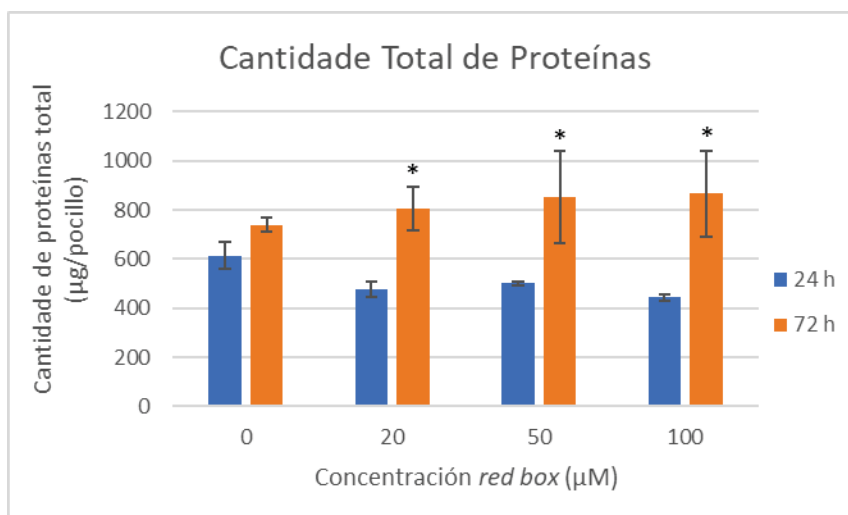
**Figura 13:** Efecto sobre a viabilidade das células HeLa das distintas concentracións de *red box* tras os dous tempos de incubación (24 e 72 h), avaliado a través do ensaio WST-1 (A) e LDH (B). As barras de erro representan a desviación estándar dos tres replicados e \* indica a existencia de diferenzas estatisticamente significativas tras comparar a mesma concentración de composto aos dous tempos de incubación ( $p < 0,05$ )

En canto á viabilidade celular da liña HeLa, no tocante ao ensaio WST-1 (Figura 13A) soamente se observaron diferenzas significativas entre os dous tempos de incubación para a concentración máis elevada do composto ( $p < 0,05$ ). No caso do ensaio LDH os valores de viabilidade foron notablemente máis elevados ca no caso do ensaio WST-1, con porcentaxes sempre superiores ao 100 %.

### **Determinación da cantidade de proteína celular nos cultivos en contacto co macrociclo red box**

A partir dos valores de absorbancia medidos nos pozos coas disolucións *stock* de seroalbúmina bovina, representouse graficamente unha recta de calibrado (Figura 20 do apartado Anexos). Unha vez calculada a ecuación da recta de calibrado, extrapoláronse os valores de concentración de proteínas para cada un dos replicados de lisado celular dos distintos tratamentos coa *red box* e dos controis negativos. Tendo en conta as dilucións realizadas para as medidas do ensaio BCA calculáronse as concentracións de proteínas en µg proteínas/pocillo (Táboa 9 do apartado Anexos). Estes datos empregáronse posteriormente para normalizar a cantidade de *red box* internalizada, inferida a partir da concentración obtida nos sobrenadantes (ver apartado seguinte).

A cantidade total de proteínas pode empregarse como unha medida indirecta da viabilidade celular polo que se representa graficamente fronte as distintas condicións ensaiadas (Figura 14). Os datos numéricos correspondentes atópanse na Táboa 9, e os  $p$ -valores nas Táboas 10 e 11, todas dispoñibles no apartado Anexos.



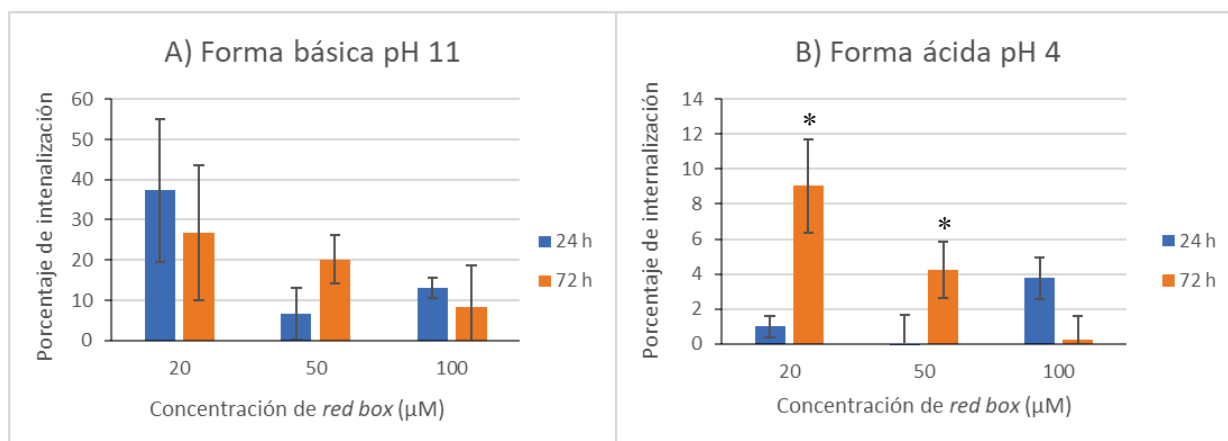
**Figura 14:** Efecto sobre a cantidade total de proteínas en células HeLa das distintas concentracións de *red box* tras dous tempos de incubación (24 e 72 h). As barras de erro representan a desviación estándar dos tres replicados e \* indica a existencia de diferenzas significativas tras comparar a mesma concentración de composto aos dous tempos de incubación ( $p < 0,05$ ).

Á vista dos resultados obtidos non se observaron diferenzas significativas entre os distintos tratamentos e entre estes co control negativo, a un mesmo tempo de incubación. Sen embargo, si que se observaron diferenzas significativas entre ambos tempos de incubación para cada unha das concentracións ensaiadas, sendo superiores os valores tras 72 h de incubación ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Determinación da cantidade de red box internalizada

A partir das medidas de absorbancia dos sobrenadantes retirados trala incubación a 24 e 72 h coas concentracións máis elevadas de *red box*, foi posible estimar indirectamente a cantidade de vehículo internalizada. A cantidade de *red box* internalizada calculouse tendo en conta a concentración de *red box* ensaiadas, o volume dos sobrenadantes e o peso molecular do macrociclo (920 g/mol). Por último, normalizouse a cantidade calculada mediante a súa división pola cantidade de proteínas obtida no ensaio *BCA*, para cada unha das concentracións. Os resultados recóllense nas *Táboas 18 e 20* para o tempo de incubación de 24 h e nas *Táboas 19 e 21* para o tempo de 72 h, todas dispoñibles no apartado *Anexos*.

A partir da cantidade de *red box* cuantificada, e tendo en conta a cantidade coa que se trataron as células, foi posible calcular as porcentaxes de internalización para cada unha das concentracións ensaiadas e representalas graficamente (*Figura 15*). Os valores numéricos atópanse recollidos nas *Táboas 12 e 13*, e os  $p$ -valores nas *Táboas 14, 15, 16 e 17*, todas elas dispoñibles no apartado *Anexos*.



**Figura 15:** Porcentaxes de internalización da *red box* en forma básica (A) e en forma ácida (B) para tres concentracións ensaiadas (20, 50 e 100 µM) e a dous tempos de incubación (24 e 72 h). As barras de erro representan a desviación estándar dos tres replicados e \* indica a existencia de diferenzas significativas tras comparar a mesma concentración de composto aos dous tempos de incubación ( $p < 0,05$ ).

En primeiro lugar, nos resultados obtidos das medidas a pH 11 (*Figura 15A*) soamente se observaron diferenzas significativas entre as porcentaxes de internalización para as concentracións de 20 e 50 µM tras 24 h de incubación ( $p < 0,05$ ). Non obstante para a concentración 20 µM a dispersión dos datos foi considerablemente elevada. Por outro lado, non se observaron diferenzas significativas entre os distintos tempos de incubación a unha mesma concentración do composto ( $p > 0,05$ ).

No caso das medidas a pH 4 (*Figura 15B*) soamente se observaron diferenzas significativas entre as concentracións de 20 e 50 µM tras 72 h de incubación ( $p < 0,05$ ). Ademais, observáronse diferenzas significativas entre os tempos de incubación para esas mesmas concentracións ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que os resultados obtidos nas medidas a pH 4 diferiron considerablemente con respecto ás medidas a pH 11. Isto pode deberse a erros experimentais e á propia sensibilidade do método, que levan a unha elevada dispersión dos datos e dificultan a interpretación dos resultados.

#### 4. DISCUSIÓN

A avaliación da biocompatibilidade é o primeiro paso para poñer a proba un composto con potencial aplicación no campo da biomedicina. Unha das posibles formas de avaliar a biocompatibilidade é a realización de estudos *in vitro* en liñas celulares. Neste tipo de test é necesario por en contacto o composto ou material de estudo cunha célula, enzima ou outro sistema biolóxico illado. As vantaxes que presentan os ensaios *in vitro* fronte a outros tipos de test de biocompatibilidade son, por exemplo, a súa relativa rapidez, baixo custe – en comparación aos ensaios en animais por exemplo –, boa capacidade de estandarización e control experimental, polo que son adecuados para *screenings* a longo prazo. Ademais, a estabilidade metabólica e xenética das liñas celulares nun cultivo continuo contribúe a estandarizar estes métodos. Como aproximación ao estudo da biocompatibilidade poden empregarse os test de citotoxicidade, en concreto os test de permeabilidade de membrana. Estes ensaios empréganse para medir a citotoxicidade a través da facilidade coa que un colorante pode atravesar a membrana celular, posto que a permeabilidade da membrana é aproximadamente equivalente á morte celular (Sakaguchi & Powers, 2012). Neste traballo leváronse a cabo dous ensaios de citotoxicidade por contacto directo, o ensaio WST-1 e o LDH. Deste xeito avalíouse o efecto do composto *red box* a dous niveis: a influencia que ten na actividade metabólica e directamente o dano sobre a membrana celular que leva á

lise da célula. O ensaio WST-1 escolleuse por ser máis rápido, sensible e amosar una redución máis eficiente fronte a outros ensaios análogos como o MTS ou o WTT (Sunil *et al.*, 2017).

O efecto do macrociclo *red box* estudouse en función da súa concentración e do tempo de incubación cas células. Empregáronse dúas liñas celulares distintas, unha normal (HFF-1) e unha tumoral (HeLa). Esta última representa a primeira liña celular de cancro humano estabilizada nun cultivo continuo, tras ser illada dun adenocarcinoma de cervix en 1951 (Masters, 2002), sendo unha das liñas celulares máis recorrentes en investigación biomédica. Por outro lado, as células HFF-1 tamén se empregan habitualmente como modelo de estudo. Os fibroblastos (o tipo celular máis abundantes da derme e o máis importante do tecido conectivo) pódense illar facilmente, e amosan un crecemento rápido e continuo. Ademais, destacan pola súa elevada expresión de receptores específicos de neurotransmisores e hormonas, capacidade de indución de factores de crecemento e importancia no mantemento de células nai (Oliveira *et al.*, 2018).

Tendo en conta os resultados de viabilidade celular (*Figuras 11, 12 e 13*), o primeiro aspecto destacable é a diferenza de sensibilidade entre os ensaios empregados. No caso do ensaio LDH, a maioría dos valores de viabilidade foron do 100 % ou superiores, algo que non sucede no caso do ensaio WST-1. Isto pódese explicar en base aos principios de ambos ensaios. No ensaio LDH, para que se forme o produto coloreado formazán é necesario que se liberen ao medio extracelular as lactato deshidroxenases citosólicas e que, polo tanto, se produza a lise da célula. En función do nivel de citotoxicidade do composto, a ruptura da membrana pode tardar en observarse – é posible que os tempos de incubación non foran o suficientemente longos – ou non chegar a suceder. Deste xeito, se a especie non é o suficientemente tóxica, é difícil apreciar diferenzas entre os resultados das distintas concentracións ensaiadas, así como a variación respecto aos controis. Por outra banda, no caso do ensaio WST-1 a redución da sal de tetrazolio prodúcese na superficie celular e depende das deshidroxenases mitocondriais do interior. Así, aínda que o efecto do composto sobre a célula sexa pequeno, vai a desencadear variacións na actividade metabólica o que permite detectar facilmente diferenzas de toxicidade entre as condicións ensaiadas.

Debido a isto, os resultados dos ensaios LDH non permitiron sacar conclusións sobre o efecto da *red box* sobre as células. Na normativa ISO para a avaliación biolóxica de dispositivos médicos (International Standard ISO 10993-5 2009) – tomada como referencia neste estudo – considérase que un composto é citotóxico cando provoca unha redución na viabilidade celular superior ao 30 %. Segundo isto, os resultados do ensaio LDH indicarían que ningunha das condicións ensaiadas foi citotóxica, o que resulta estraño tratándose de compostos non naturais. Os resultados dos ensaios WST-1 foron máis clarificadores. No *screening* de citotoxicidade do composto púidose comprobar que o macrociclo ten un efecto citotóxico máis elevado na liña HFF-1 ca na liña HeLa. Este efecto é especialmente notable no caso das concentracións máis elevadas, existindo diferenzas significativas entre ambas liñas, con reducións nas porcentaxes de viabilidade de ata o 30 % na liña HFF-1. Estas diferenzas poden deberse ao carácter tumoral das células HeLa que as faría menos sensibles ao efecto do macrociclo debido á súa maior capacidade de proliferación (Andreef *et al.*, 2003). Por outro lado, na avaliación da citocompatibilidade ao longo do tempo non se observaron diferenzas significativas entre os dous tempos de incubación para a liña HFF-1, se ben observouse unha lixeira redución da mesma tras 72 horas de incubación coa maior concentración de composto. No caso da liña celular HeLa soamente se observaron diferenzas significativas para a concentración 100  $\mu$ M, existindo unha maior redución da viabilidade celular tras 72 h de incubación. Aínda así, ningunha das concentracións

ensaiadas podería ser definida como citotóxica segundo a normativa ISO.

Finalmente, púidose estimar de xeito indirecto a cantidade de composto internalizada – normalizada coa cantidade total de proteínas – e calculouse a porcentaxe de *red box* internalizado respecto ás concentracións ensaiadas. As medidas da cantidade total de proteína poden correlacionarse co número de células, sendo polo tanto un indicativo da viabilidade e proliferación celular (Butler *et al.*, 2014). Os resultados obtidos amosan que as distintas concentracións de *red box* ensaiadas non tiveron un efecto significativo sobre a cantidade total de proteínas, con respecto ao control negativo. Sen embargo, si que se observaron diferenzas significativas entre os distintos tempos de incubación, sendo superiores os valores tras 72 h de incubación. Estas diferenzas poden atribuírse á un incremento do número de células ó longo do tempo levando, polo tanto, á detección dunha maior cantidade de proteína. Estas observacións concordan co observado no ensaio de viabilidade celular ó longo do tempo para as concentracións de 20 e 50  $\mu\text{M}$ , no que se detectaron porcentaxes de supervivencia celular en torno ó 100% aos dous tempos de incubación. Porén, estes datos contrastan co observado neste ensaio coa maior concentración de composto (100  $\mu\text{M}$ ), no que se detectou unha redución da viabilidade ás 72 h de incubación. Debido que o contido de proteínas nos cultivos celulares varía substancialmente no transcurso dos mesmos por mor dos cambios na taxa de crecemento celular ou da composición do medio, é posible que a presenza dunha maior cantidade de composto nestas condicións de ensaio, puidesen afectar a estas medidas e explicar estas discrepancias (Butler *et al.*, 2014). En canto as porcentaxes de internalización, os valores máis altos detectáronse para a concentración de 20  $\mu\text{M}$  con ambos métodos. No caso das medidas a pH 11 obtívose unha porcentaxe aproximada de internalización dun 37 % ás 24h, mentres que nas medidas a pH 4 a maior porcentaxe cuantificada foi en torno a un 9% ás 72 h. Neste sentido os valores das porcentaxes de internalización a pH 11 diferiron considerablemente dos obtidos a pH 4, sendo considerablemente superiores. Estas diferenzas poden deberse á propia sensibilidade do ensaio e a erros experimentais o que dificulta a interpretación dos resultados obtidos. Sería necesario realizar outros estudos como a medición da cantidade de *red box* presente nos lisados celulares mediante outros métodos máis sensibles como por exemplo HPLC (X. Zhang *et al.*, 2019), debido a que a propia heteroxeneidade dos mesmos dificulta levar a cabo a determinación da cantidade de composto mediante medidas de absorbancia.

## CONCLUSIÓNS

A avaliación preliminar da biocompatibilidade do macrociclo *red box* permitiu obter as seguintes conclusións:

1. O ensaio LDH resultou ser menos sensible co ensaio WST-1 neste estudo, polo que se tomaron como referencia os resultados deste último.
2. Na liña celular HeLa o macrociclo non resultou citotóxico para ningunha das concentracións ensaiadas e tampouco amosou unha variación da citotoxicidade ao longo do tempo, excepto para a concentración de 100  $\mu\text{M}$ , que amosou unha redución da viabilidade ás 72 h.
3. Na liña celular HFF-1 o composto resultou ser máis citotóxico, se ben as porcentaxes de viabilidade non foron inferiores ao 70 % para as concentracións ensaiadas. Ademais, non se observaron diferenzas de toxicidade entre os dous tempos de incubación para ningunha das concentracións ensaiadas.



4. A determinación da cantidade total de proteínas mediante o ensaio BCA, serviu como indicativo da proliferación celular, sen atoparse diferenzas significativas entres os distintos tratamentos de *red box* e o control negativo.

5. As medidas de absorbancia nos sobrenadantes permitiron calcular a cantidade de *red box* internalizada e normalizala coa cantidade de proteínas total determinada mediante o ensaio BCA, así como calcular as porcentaxes de internalización. A maior internalización de *red box* foi detectada trala incubación durante 24 horas cunha concentración de 20  $\mu\text{M}$ , se ben requírense outros métodos mais sensibles para poder extraer conclusións mais precisas.

## CONCLUSIONES

La evaluación preliminar de la biocompatibilidad del macrociclo *red box* permitió obtener las siguientes conclusiones:

1. El ensayo LDH resultó ser menos sensible que el ensayo WST-1 en este estudio, por lo que los resultados de este último se tomaron como referencia.

2. En la línea celular HeLa el macrociclo no fue citotóxico para ninguna de las concentraciones ensayadas ni mostró una variación en la citotoxicidad con el tiempo, excepto para la concentración 100  $\mu\text{M}$ , que mostró una reducción de la viabilidad a las 72 h.

3. En la línea celular HFF-1, el compuesto resultó ser más citotóxico, aunque los porcentajes de viabilidad no fueron inferiores al 70% para las concentraciones ensayadas. Además, no se observaron diferencias en la toxicidad entre los dos tiempos de incubación para ninguna de las concentraciones probadas.

4. La determinación de la cantidad total de proteína mediante el ensayo BCA, sirvió como indicativo de proliferación celular, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de *red box* y el control negativo.

5. Las medidas de absorbancia en los sobrenadantes permitieron calcular la cantidad de *red box* internalizada y normalizarla con la cantidad total de proteína determinada por el ensayo BCA, así como calcular los porcentajes de internalización. La mayor internalización de *red box* se detectó tras una incubación de 24 horas con una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , aunque se requieren otros métodos más sensibles para poder sacar conclusiones más precisas.

## CONCLUSIONS

The preliminary evaluation of the biocompatibility of the *red box* macrocycle led to the following conclusions:

1. In this study, the LDH assay showed to be less sensitive than the WST-1 assay so the results of the latter one were taken as a reference.

2. In the HeLa cell line, the macrocycle was not cytotoxic for any of the tested concentrations, and did not show a variation in cytotoxicity with time, except for the 100  $\mu\text{M}$  concentration, which showed a reduction in viability at 72 h.

3. In the HFF-1 cell line, the compound proved to be more cytotoxic, although the viability percentages were not lower than 70% for the tested concentrations. Furthermore, no differences in toxicity were observed between the two incubation times for any of the tested concentrations.

4. The determination of the total amount of protein by BCA assay, served as an indication of cell proliferation, without finding significant differences between the different *red box* treatments and the negative control.

5. Absorbance measurements in the supernatants allowed us to calculate the amount of internalized *red box* and to normalize it with the total amount of protein determined by the BCA assay, as well as to calculate the internalization percentages. The highest internalization of *red box* was detected after a 24 h incubation with a concentration of 20  $\mu\text{M}$ , although more sensitive methods are required to draw more precise conclusions.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adan, A., Kiraz, Y. & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Andreeff, M., Goodrich, D.W., & Pardee, A.B. (2003). *Proliferation*. In Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, M.D., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., & Frei, E. III (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*. BC Decker Inc. Toronto. Canada <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13035/>
- Ariga, K., & Kunitake, T. (2006). *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications: Advanced Textbook*, 1–208. Springer. Nueva York. EE.UU. <https://doi.org/10.1007/B137036>
- Asakawa, M., Dehaen, W., L'abbé, G., Menzer, S., Nouwen, J., Raymo, F.M., Stoddart, J.F., & Williams, D.J. (1996). Improved template-directed synthesis of cyclobis(paraquat-p-phenylene). *Journal of Organic Chemistry*, 61(26), 9591–9595. <https://doi.org/10.1021/jo961488i>
- Barnes, J. C., Juríček, M., Vermeulen, N. A., Dale, E. J., & Stoddart, J. F. (2013). Synthesis of ExnBox Cyclophanes. *Journal of Organic Chemistry*, 78(23), 11962–11969. <https://doi.org/10.1021/JO401993N>
- Blanco-Gómez, A., Fernández-Blanco, Á., Blanco, V., Rodríguez, J., Peinador, C., & García, M. D. (2019). Thinking Outside the “Blue Box”: Induced Fit within a Unique Self-Assembled Polycationic Cyclophane. *Journal of the American Chemical Society*, 141(9), 3959–3964. <https://doi.org/10.1021/JACS.8B12599>
- Blanco-Gómez, A., Neira, I., Barriada, J. L., Melle-Franco, M., Peinador, C., & García, M. D. (2019). Thinking outside the “Blue Box”: from molecular to supramolecular pH-responsiveness. *Chemical Science*, 10(46), 10680–10686. <https://doi.org/10.1039/C9SC04489B>
- Braegelman, A. S., & Webber, M. J. (2019). Integrating Stimuli-Responsive Properties in Host-Guest Supramolecular Drug Delivery Systems. *Theranostics*, 9(11), 3017. <https://doi.org/10.7150/THNO.31913>
- Butler, M., Spearman, M., & Braasch, K. (2014). *Monitoring cell growth, viability, and apoptosis*. In Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: methods and protocols*, 1104, 169-192. Humana Press. Nueva Jersey. EE.UU.
- Fogel, D. B. (2018). Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. *Contemporary Clinical Trials Communications*, 11, 156. <https://doi.org/10.1016/J.CONCTC.2018.08.001>

- Hopf, H., & Gleiter, R. (2004). *Modern Cyclophane Chemistry*. Wiley-VCH. Weinheim. Alemania.
- International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO Standard No. 10993-5:2009). <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- International Organization for Standardization. (2021). Standards. Recuperado 8 Septiembre, 2021, de <https://www.iso.org/standards.html>.
- Jurak, M., Wiącek, A. E., Ładniak, A., Przykaza, K., & Szafran, K. (2021). What affects the biocompatibility of polymers? *Advances in Colloid and Interface Science*, 294, 102451. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2021.102451>
- Ma, X., & Zhao, Y. (2014). Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions. *Chemical Reviews*, 115(15), 7794–7839. <https://doi.org/10.1021/CR500392W>
- Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2002 2:4, 2(4), 315–319. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
- Niles, A. L., Moravec, R.A., & Riss, T. L.. (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomics*, 3(1), 33–41. <https://doi.org/10.2174/1875397300903010033>
- Niles, A. L., Moravec, R.A., & Riss, T. L. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(6), 655–669. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.6.655>
- Oliveira, T., Costa, I., Marinho, V., Carvalho, V., Uchôa, K., Ayres, C., Teixeira, S., & Vasconcelos, D. F. P. (2018). Human foreskin fibroblasts: from waste bag to important biomedical applications: <https://doi.org/10.1177/2051415818761526>, 11(6), 385–394. <https://doi.org/10.1177/2051415818761526>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Roche (2018). *Cell Proliferation Reagent WST-1*. Cat. No.:11 644 807 001, 05 015 944 001. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf>.
- Sakaguchi, R. L., & Powers, J. M. (2012). Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. In *Craig's Restorative Dental Materials*, Elsevier. 109–133.
- Sonawane, S. J., Kalhapure, R. S., & Govender, T. (2017). Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 45–65. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2016.12.011>
- Sunil, D., Kamath, P., & Chandrashekhar H, R. (2017). In Vitro Bioassay Techniques for Anticancer Drug Discovery and Development. In *In Vitro Bioassay Techniques for Anticancer Drug Discovery and Development*. <https://doi.org/10.4324/9781315191256>
- Tatum, L. A., Su, X., & Aprahamian, I. (2014). Simple Hydrazone Building Blocks for Complicated Functional Materials. *Accounts of Chemical Research*, 47(7), 2141–2149. <https://doi.org/10.1021/AR500111F>
- ThermoFisher Scientific. *Micro BCA Protein Assay Kit*. Cat. No.:23235. Recuperado de

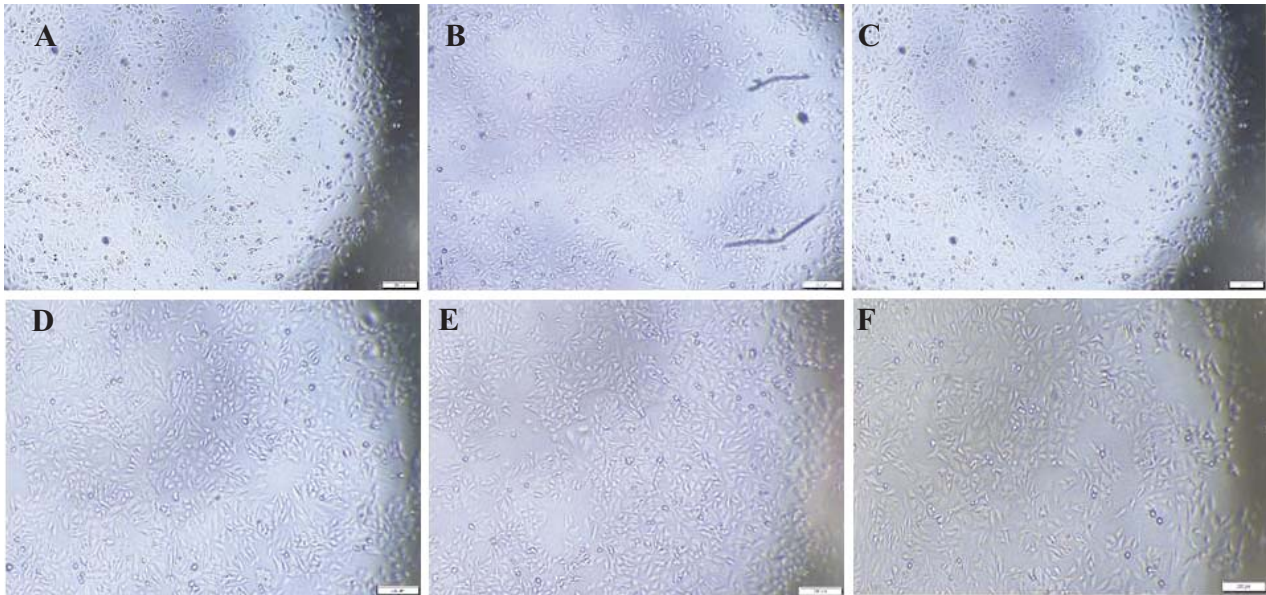


[https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011237\\_Micro\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011237_Micro_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)

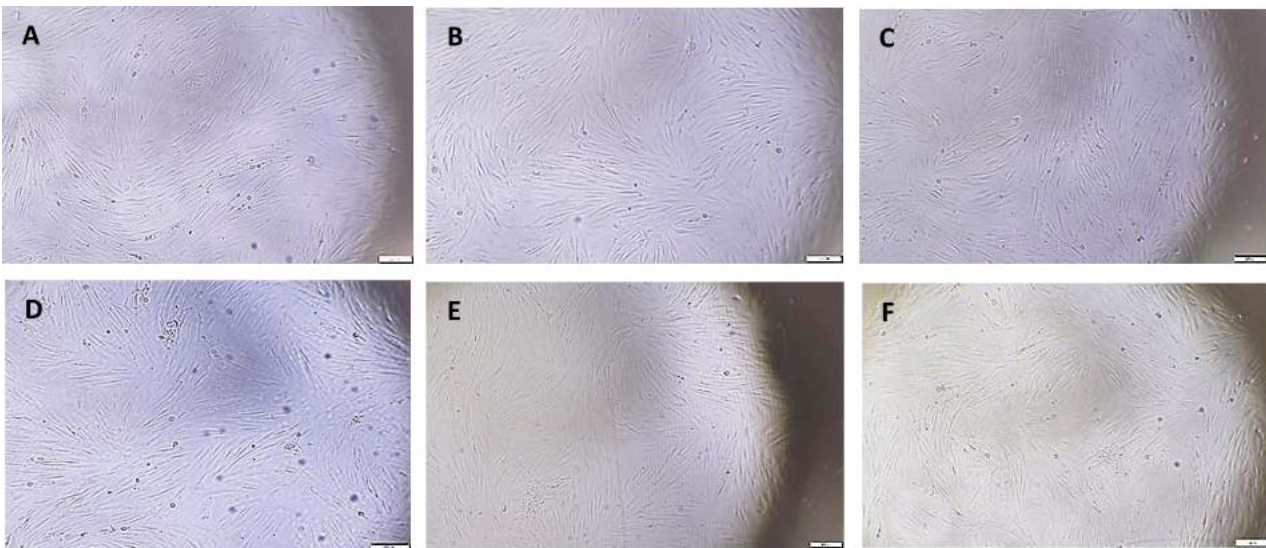
- ThermoFisher Scientific. *Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit*. Cat. No.: 88953, 88954. Recuperado de [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011851\\_Pierce\\_LDH\\_Cytotoxicity\\_Asy\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011851_Pierce_LDH_Cytotoxicity_Asy_UG.pdf)
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, M. R., & Alam, M. M. (2014). A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 6(2), 69. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.04.023>
- Yudin, A. K. (2014). Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chemical Science*, 6(1), 30–49. <https://doi.org/10.1039/C4SC03089C>
- Zhang, J., & Ma, P. X. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2013.05.001>
- Zhang, P., Yang, B., Fang, X., Cheng, Z., & Yang, M. (2012). Synthesis, crystal structure and biological activity of novel diester cyclophanes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(10), 1771–1775. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000045>
- Zhang, X., Xu, X., Li, S., Li, L., Zhang, J., & Wang, R. (2019). A Synthetic Receptor as a Specific Antidote for Paraquat Poisoning. *Theranostics*, 9(3), 633. <https://doi.org/10.7150/THNO.31485>

## ANEXOS

### Estado das células tras a incubación cos compostos



**Figura 16:** Fotografías ao microscopio óptico (10X; barra=200µm) do estado dos cultivos HeLa logo de 24 h de incubación con distintas concentracións de *red box*: 0,05 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 20 (E), 50 µM.

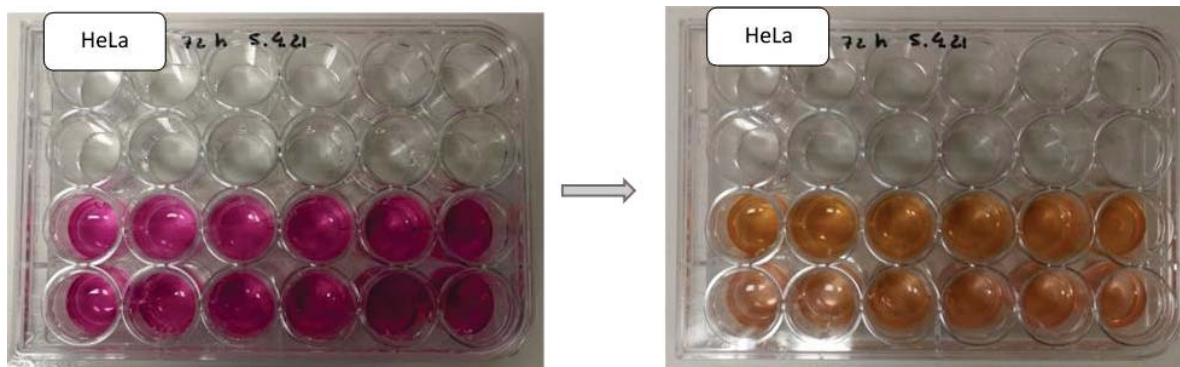


**Figura 17:** Fotografías ao microscopio óptico (10X; barra=200µm) do estado dos cultivos HFF-1 logo de 24 h de incubación con distintas concentracións de *red box*: 0,05 (A), 1 (B), 5 (C), 10 (D), 20 (E), 50 µM.

## Ensaio de citocompatibilidade

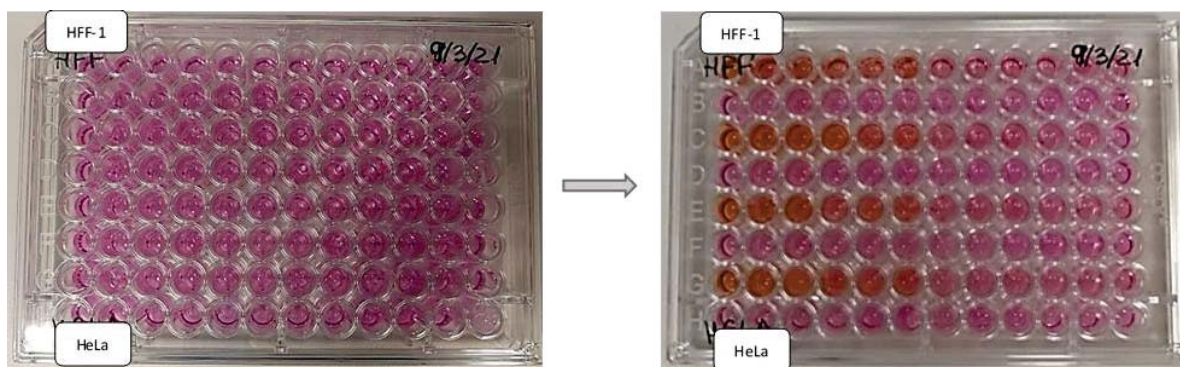
### Resultados cualitativos

#### Ensaio WST-1



**Figura 18:** Exemplo de comparación das cores do medio contido nos pozos antes (esquerda) e despois (dereita) da incubación co reactivo para o ensaio WST-1. Correspóndese coa liña HeLa e o tempo de 72 h.

#### Ensaio LDH



**Figura 19:** Exemplo de comparación das cores do medio contido nos pozos antes (esquerda) e despois (dereita) da incubación co reactivo para o ensaio LDH. Correspóndese coa liña HFF-1 (filas A-D) e a liña HeLa (filas E-H) e o tempo de 24 h.

### Resultados cuantitativos

#### Screening da citotoxicidade do macrociclo red box

	WST-1						
	% de Viabilidade Celular (Media $\pm$ SD)						
	0,05 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
HFF-1	66,08 $\pm$ 7,27	68,75 $\pm$ 2,85	65,42 $\pm$ 6,68	81,86 $\pm$ 6,81	69,56 $\pm$ 3,77	69,95 $\pm$ 8,50	63,38 $\pm$ 5,47
HeLa	90,83 $\pm$ 4,98	80,02 $\pm$ 6,28	73,47 $\pm$ 9,21	92,41 $\pm$ 6,51	87,41 $\pm$ 10,20	90,01 $\pm$ 5,02	91,12 $\pm$ 10,09

**Táboa 1:** Resultados dos ensaios WST-1 en HFF-1 e HeLa ás 24 h de incubación co macrociclo red box (Figura 11).



		WST-1						
		<i>p</i> -valor ( $\alpha = 0,05$ )						
		0,05 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
HFF-1	HeLa	0,001424	0,0281	0,1063	0,08576	0,04915	0,02257	0,0002889

**Táboa 2:** Análise estatística dos resultados dos ensaios WST-1 en HFF-1 e HeLa (*Figura 11*): comparación dos valores medios de % viabilidade celular entre ambas liñas a unha mesma concentración de *red box* e tempo de incubación (24 h) a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

*Cinética da viabilidade celular en contacto co macrociclo red box ó longo do tempo*

WST-1 HFF-1			
% de Viabilidade Celular (Media $\pm$ SD)			
	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	102,16 $\pm$ 5,11	102,47 $\pm$ 5,46	105,93 $\pm$ 8,03
72 h	99,70 $\pm$ 12,30	101,41 $\pm$ 0	95,62 $\pm$ 8,20

**Táboa 3:** Resultados do ensaio WST-1 en HFF-1 ás 24 h e 72 h de incubación co macrociclo *red box* (*Figura 12A*).

LDH HFF-1			
% de Viabilidade Celular (Media $\pm$ SD)			
	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	100,36 $\pm$ 0,12	100,50 $\pm$ 0,13	99,39 $\pm$ 0,28
72 h	100,41 $\pm$ 0,12	99,39 $\pm$ 0,25	100,80 $\pm$ 0

**Táboa 4:** Resultados do ensaio LDH en HFF-1 ás 24 h e 72 h de incubación co macrociclo *red box* (*Figura 12B*).

		WST-1 HFF-1		
		<i>p</i> -valor ( $\alpha = 0,05$ )		
		20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	72 h	0,2112	0,1138	0,1507

**Táboa 5:** Análise estatística dos resultados dos ensaios WST-1 en HFF-1 (*Figura 12A*): comparación dos valores medios de % viabilidade celular entre dous tempos de incubación a unha mesma concentración de *red box* a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

WST-1 HeLa			
% de Viabilidade Celular (Media $\pm$ SD)			
	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	111,59 $\pm$ 11,63	96,48 $\pm$ 7,50	113,48 $\pm$ 8,02
72 h	103,88 $\pm$ 1,47	100,09 $\pm$ 3,95	81,14 $\pm$ 5,28

**Táboa 6:** Resultados do ensaio WST-1 en HeLa ás 24 h e 72 h de incubación co macrociclo *red box* (*Figura 13A*).

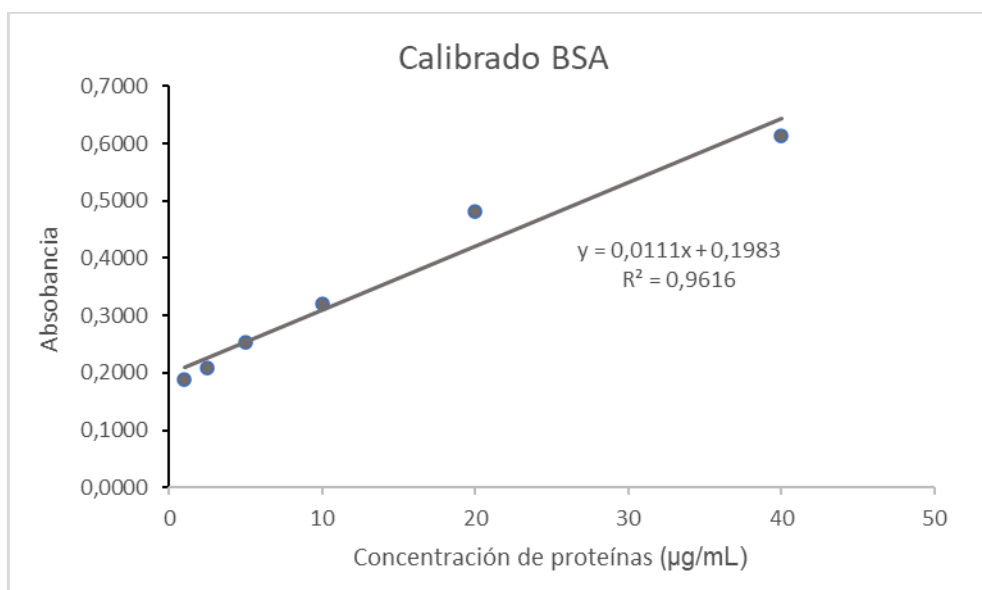
LDH HeLa			
% de Viabilidad Celular (Media ± SD)			
	20 µM	50 µM	100 µM
24 h	120,52 ± 5,92	124,28 ± 2,12	136,89 ± 0
72 h	122,73 ± 2,12	135,33 ± 0	126,99 ± 0,45

**Táboa 7:** Resultados do ensaio LDH en HeLa ás 24 h e 72 h de incubación co macrociclo *red box* (Figura 13B).

WST-1 HeLa			
p-valor ( $\alpha = 0,05$ )			
	20 µM	50 µM	100 µM
24 h	0,1956	0,1427	0,01904
72 h			

**Táboa 8:** Análise estatística dos resultados dos ensaios WST-1 en HeLa (Figura 13A): comparación dos valores medios de % viabilidade celular entre dous tempos de incubación a unha mesma concentración de *red box* a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

*Determinación da cantidade de proteína celular nos cultivos en contacto co macrociclo red box*



**Figura 20:** Recta de calibrado do ensaio BCA preparada a partir de disolucións *stock* de seroalbúmina bovina (BSA) de 1, 2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL.

BCA HeLa				
µg de proteína/pocillo (Media ± SD)				
	0 µM	20 µM	50 µM	100 µM
24 h	612,50 ± 54,67	477,34 ± 32,51	500,69 ± 9,71	443,67 ± 11,30
72 h	738,68 ± 28,78	805,13 ± 86,96	853,63 ± 187,97	866,20 ± 173,98

**Táboa 9:** Resultados do ensaio BCA en HeLa ás 24 e 72 h de incubación co macrociclo *red box* (Figura 14).

		BCA HeLa			
		p-valor ( $\alpha = 0,05$ )			
		0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
24 h	72 h	0,05805	0,004688	0,03894	0,02883

**Táboa 10:** Análise estatística dos resultados do ensaio BCA en HeLa (Figura 14): comparación dos valores medios de  $\mu\text{g}$  de proteína/pocillo entre dous tempos de incubación a unha mesma concentración de *red box* a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

BCA HeLa			
p-valor ( $\alpha = 0,05$ )			
		24 h	72 h
0 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	0,0573	0,1010
0 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,02551	0,2185
0 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	0,01201	0,1357
20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,2158	0,3914
20 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	0,1458	0,1756
50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	0,0007732	0,4777

**Táboa 11:** Análise estatística dos resultados do ensaio BCA en HeLa (Figura 14): comparación dos valores medios de  $\mu\text{g}$  de proteína/pocillo entre as distintas concentracións de *red box* a un mesmo tempo de incubación a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

### Determinación da cantidade de *red box* internalizada

Forma básica pH 11				
% Internalización (Media $\pm$ SD)				
		20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
24 h	37,36 $\pm$ 17,18	6,71 $\pm$ 6,47	13,04 $\pm$ 2,42	
72 h	26,72 $\pm$ 16,76	20,21 $\pm$ 5,99	8,45 $\pm$ 10,15	

**Táboa 12:** Resultados para a determinación a pH 11 dos porcentaxes de internalización da *red box* en HeLa (Figura 15A) tras 24 e 72 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ,

Forma ácida pH 4				
% Internalización (Media $\pm$ SD)				
		20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
24 h	0,99 $\pm$ 0,62	-0,33 $\pm$ 2,01	3,76 $\pm$ 1,20	
72 h	9,03 $\pm$ 2,67	4,24 $\pm$ 1,60	0,22 $\pm$ 1,37	

**Táboa 13:** Resultados para a determinación a pH 4 dos porcentaxes de internalización da *red box* en HeLa (Figura 15B) tras 24 e 72 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ,

		Forma básica pH 11		
		p-valor ( $\alpha = 0,05$ )		
		20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	72 h	0,3205	0,06301	0,2068

**Táboa 14:** Análise estatística dos resultados das medidas de internalización a pH 11 (Figura 15A): comparación dos valores medios de porcentaxe de internalización entre dous tempos de incubación a unha mesma concentración de *red box* a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ).

		Forma básica pH 11	
		p-valor ( $\alpha = 0,05$ )	
		24 h	72 h
20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,03444	0,2563
20 $\mu$ M	100 $\mu$ M	0,07418	0,09228
50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	0,1666	0,1458

**Táboa 15:** Análise estatística dos resultados das medidas de internalización a pH 11 (Figura 15A): comparación dos valores medios de porcentaxe de internalización entre as distintas concentracións de *red box* a un mesmo tempo de incubación a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ).

		Forma ácida pH 4		
		p-valor ( $\alpha = 0,05$ )		
		20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 h	72 h	0,01310	0,008709	0,09317

**Táboa 16:** Análise estatística dos resultados das medidas de internalización a pH 4 (Figura 15B): comparación dos valores medios de porcentaxe de internalización entre dous tempos de incubación a unha mesma concentración de *red box* a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

		Forma básica pH 4	
		p-valor ( $\alpha = 0,05$ )	
		24 h	72 h
20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,05163	0,008239
20 $\mu$ M	100 $\mu$ M	0,1046	0,1267
50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	0,1466	0,1864

**Táboa 17:** Análise estatística dos resultados das medidas de internalización a pH 4 (Figura 15B): comparación dos valores medios de porcentaxe de internalización entre as distintas concentracións de *red box* a un mesmo tempo de incubación a través do test *t-Student*, a un nivel de confianza do 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Os *p*-valores en vermello indican a existencia de diferenzas estatisticamente significativas ( $p < \alpha$ ).

Medidas de Sobrenadantes 24 h pH 11				
Incubación	[ <i>reb box</i> ] sobr. ( $\mu\text{M}$ )	[ <i>reb box</i> ] int. ( $\mu\text{M}$ )	Cantidad <i>red box</i> int. (ng)	Cantidad <i>red box</i> norm. (ng <i>red box</i> / $\mu\text{g}$ proteínas)
20 $\mu\text{M}$	12,58	7,42	6830,12	14,31
	8,95	11,05	10166,79	21,30
	16,06	3,94	3623,46	7,59
50 $\mu\text{M}$	43,73	6,27	5765,49	11,52
	46,08	3,92	3606,69	7,20
	50,13	-0,13	-116,55	-0,23
100 $\mu\text{M}$	89,71	10,29	9462,81	21,33
	85,99	14,00	12884,17	29,04
	85,17	14,83	13648,17	30,76

**Táboa 18:** Resultados para a determinación indirecta a pH 11 da cantidade de *red box* internalizada (int.), tras 24 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , normalizada (norm.) co contido de proteínas. En vermello aparece marcado un dato anómalo.

Medidas de Sobrenadantes 72 h pH 11				
Incubación	[ <i>Reb box</i> ] sobr. ( $\mu\text{M}$ )	[ <i>Reb box</i> ] int. ( $\mu\text{M}$ )	Cantidad <i>red box</i> int. (ng)	Cantidad <i>red box</i> norm. (ng <i>red box</i> / $\mu\text{g}$ proteínas)
20 $\mu\text{M}$	16,12	3,88	3569,28	4,43
	17,026	2,98	2736,57	3,40
	10,82	9,18	8445,85	10,49
50 $\mu\text{M}$	37,97	12,03	11066,66	12,96
	43,35	6,65	6116,35	7,17
	38,37	11,64	10704,15	12,54
100 $\mu\text{M}$	103,28	-3,28	-3014,04	-3,48
	85,78	14,22	13083,52	15,10
	85,60	14,40	13245,55	15,29

**Táboa 19:** Resultados para a determinación indirecta a pH 11 da cantidade de *red box* internalizada (int.), tras 72 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , normalizada (norm.) co contido de proteínas. En vermello aparece marcado un dato anómalo.



Medidas de Sobrenadantes 24 h pH 4				
Incubación	[red box] sobr. (μM)	[red box] int. (μM)	Cantidad red box int. (ng)	Cantidad red box norm. (ng red box/μg proteínas)
20 μM	19,87	0,13	116,78	0,24
	19,66	0,34	315,86	0,66
	19,87	0,13	116,39	0,24
50 μM	51,32	-1,32	-1211,53	-2,42
	49,50	0,50	464,54	0,93
	51,14	-1,14	-1047,31	-2,09
100 μM	94,86	5,14	4728,33	10,66
	96,82	3,18	2926,35	6,60
	97,03	2,97	2730,20	6,15

**Táboa 20:** Resultados para a determinación indirecta a pH 4 da cantidade de *red box* internalizada (int.), tras 24 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100 μM, normalizada (norm.) co contido de proteínas. En vermello aparecen marcados datos anómalos.

Medidas de Sobrenadantes 72 h pH 4				
Incubación	[red box] sobr. (μM)	[red box] int. (μM)	Cantidad red box int. (ng)	Cantidad red box norm. (ng red box/μg proteínas)
20 μM	18,80	1,20	1107,13	1,38
	17,78	2,22	2041,65	2,54
	18,00	2,00	1836,61	2,28
50 μM	48,77	1,23	1132,42	1,33
	47,22	2,78	2553,09	2,99
	47,64	2,36	2167,41	2,54
100 μM	103,04	-3,04	-2800,97	-3,23
	98,81	1,19	1092,06	1,26
	100,75	-0,75	-686,47	-0,79

**Táboa 21:** Resultados para a determinación indirecta a pH 4 da cantidade de *red box* internalizada (int.), tras 72 h de incubación coas concentracións de 20, 50 e 100 μM, normalizada (norm.) co contido de proteínas. En vermello aparecen marcados datos anómalos.