

## TITULO DEL PROYECTO.

Generación de células productoras de insulina mediante uso de péptidos autoensamblantes con capacidad instructiva.

## INVESTIGADOR PRINCIPAL Y QUE PRESENTARÁ EL PROYECTO AL CONGRESO.

Montserrat Nacher Garcia ([mnacher@bellvitgehospital.cat](mailto:mnacher@bellvitgehospital.cat))

Hospital Universitario de Bellvitge - Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

Granvia d'Hospitalet, 199

08908 L'Hospitalet de Llobregat

Barcelona.

## RESUMEN DEL PROYECTO.

**Introducción:** Actualmente, el reemplazo de las células  $\beta$  es la única alternativa que permite un control realmente fisiológico de los niveles de glucosa en sangre. No obstante, hay un enorme desequilibrio entre el número de donantes de páncreas y el número de pacientes diabéticos, lo cual restringe su uso clínico. La expansión *in vitro* de células beta representa una estrategia sumamente atractiva para la generación de un gran número de células productoras de insulina, que podrían ser utilizadas para el trasplante de pacientes con DM1. Sin embargo, las células beta, al ser cultivadas y expandidas sufren un proceso de desdiferenciación que comporta la pérdida de la capacidad de producir insulina. Por ello, es necesario rediferenciarlas para que sean capaces de volver a secretar insulina y sean válidas para el trasplante. Las nanofibras de péptidos autoensamblantes (SAPNF) promueven y mantienen la función de diversos tipos celulares. **Hipotetizamos** que las SAPNF unidas (funcionalizadas) a péptidos presentes en el microambiente del islote pueden informar ó instruir las células expandidas a partir de islotes humanos para que vuelvan a producir insulina.

**Objetivos:** 1) diseñar SAPNF unidas a péptidos instructivos que permitan recrear en cultivo parte del microambiente que el islote pancreático tiene *in vivo* en el páncreas 2) inducir la rediferenciación de las células expandidas a partir de islotes humanos, mediante cultivo en SAPNF funcionalizadas con péptidos instructivos, con el fin de obtener células productoras de insulina aptas para su aplicación en la terapia celular de la DM1.

**Etapas del estudio:** 1) preparación de las SAPNF funcionalizadas y caracterización fisicoquímica, 2) cultivo y caracterización de las células  $\beta$  humanas expandidas y 3) rediferenciación celular mediante cultivo con SAPNF funcionalizadas y posterior caracterización celular.

**Resultados esperados:** rediferenciación de las células expandidas para la obtención de un gran número de células productoras de insulina.

## GRUPO DE INVESTIGACIÓN.

El Grupo de Investigación en Diabetes y Metabolismo del IDIBELL tiene el reconocimiento como Grupo de Investigación Consolidado por parte de la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias (AGAUR) de Cataluña.

El grupo está formado por investigadores clínicos y básicos pertenecientes al Hospital Universitari de Bellvitge, el IDIBELL (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge) y la Universidad de Barcelona, y es miembro de CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y Enfermedades Metabólicas). Está liderado por el Dr. Eduard Montanya y, actualmente, cuenta con 3 investigadores, 2 investigadores pre-doctorales, 3 investigadores clínicos, 1 técnico de laboratorio y 2 estudiantes de Máster. El principal interés de nuestro grupo es el estudio de la biología celular y molecular de las células del islote pancreático, con un particular interés en la terapia celular de la diabetes. Las líneas de investigación del grupo son la plasticidad de la masa de células beta, la terapia celular (trasplante de islotes pancreáticos) y regenerativa en la diabetes y los mecanismos de lesión de la célula beta. Otras importantes actividades son los ensayos clínicos en diabetes.

Nuestro grupo de investigación cuenta con un laboratorio específicamente equipado para la realización de aislamientos de islotes pancreáticos humanos. Dispone de presión positiva y control de partículas ambientales, cabinas de flujo laminar para trabajar en condiciones estériles, centrífugas refrigeradas e incubadores de CO<sub>2</sub> para el cultivo de las células de los islotes. El laboratorio general cuenta con diferentes salas: 1) sala de cultivo celular, 2) sala de histología, 3) sala para ultracongeladores y nitrógeno líquido para criopreservación, 4) cámara fría, 5) sala de microscopía con un microscopio de fluorescencia, 6) laboratorio general con neveras, congeladores, espectrofotómetro de placas, baños de agua, termociclador para PCR convencional y equipos generales. Además dispone de 8 ordenadores.

También se cuenta con los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona que tienen microscopio confocal, termocicladores para *real-time PCR* y lector de placas para cuantificar fluorescencia, absorbancia y luminiscencia.

El laboratorio del Dr. Carlos Semino, que será investigador colaborador del proyecto, cuenta con la tecnología necesaria para la caracterización estructural de las las SAPNF así como para la realización de los cultivos celulares en SAPNF unidas a péptidos instructivos (sala de cultivo celular con cabinas de flujo laminar y incubadores de CO<sub>2</sub>), ultracongeladores, microscopio de fluorescencia, baño con ultrasonidos para la preparación de las SAPNF, baños de agua, termociclador para PCR convencional y equipos generales.

El equipo que realizará el proyecto estará formado por la Dra. Montserrat Nacher, un investigador pre-doctoral, Crístofer García (Técnico Superior de laboratorio), el Dr. Carlos Semino y el Dr. Eduard Montanya.

## Cinco artículos científicos que se relacionen con diabetes tipo 1.

### **A role for the host in the roadmap to diabetes stem cell therapy.**

Soria B, Montanya, E, Martin F, Hmadcha A.

Diabetes 2016;65(5):1155-7

### **Report from IPITA-TTS opinion leaders meeting on the future of $\beta$ -cell replacement.**

Bartlett ST<sup>1</sup>, Markmann JF, Johnson P, Korsgren O, Hering BJ, Scharp D, Kay TW, Bromberg J, Odorico JS, Weir GC, Bridges N, Kandaswamy R, Stock P, Friend P, Gotoh M, Cooper DK, Park CG, O'Connell P, Stabler C, Matsumoto S, Ludwig B, Choudhary P, Kovatchev B, Rickels MR, Sykes M, Wood K, Kraemer K, Hwa A, Stanley E, Ricordi C, Zimmerman M, Greenstein J, Montanya E, Otonkoski T.

Transplantation 2016;100 Suppl 2: S1-44.

### **Human serum versus human serum albumin supplementation in human islet pretransplantation culture: in vitro and in vivo assessment.**

Nacher M<sup>1</sup>, Estil Les E, Garcia A, Nadal B, Pairó M, Garcia C, Secanella L, Novials A, Montanya E.

Cell Transplant 2016;25(2):343-52.

### **Increased $\beta$ -cell replication and $\beta$ -cell mass regeneration in syngeneically transplanted rat islets overexpressing insulin-like growth factor II.**

Estil les E<sup>1</sup>, Téllez N, Escoriza J, Montanya E.

Cell Transplant 2012;21:2119-29.

### **Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome.**

Téllez N, Montolio M, Estil.les E, Escoriza J, Soler J, Montanya E.

Diabetologia 2007;50:602-11.

*Nota: este mes de Enero, se ha publicado un artículo en una relevante revista de divulgación científica que no hemos incluido en el listado anterior puesto que no se trata propiamente de una revista científica, pero que hemos creído oportuno incluir en un apartado independiente debido a la estrecha vinculación que tiene con la DM1.*

### **Los caminos hacia la curación de la diabetes.**

Martin F, Montanya E, Soria B.

Investigación y Ciencia 2017,484

## Estrategias para la posible curación de la DM1 realizadas previamente por el grupo.

Nuestro grupo investiga desde hace más de 25 años en islote pancreático, siendo una de sus líneas principales el trasplante de islotes para el tratamiento de la diabetes. Nuestra experiencia en trasplante de islotes de rata y ratón nos permite curar, de forma rutinaria, modelos experimentales de diabetes tipo 1 en animales de experimentación. El estudio de la regulación y regeneración de la masa de células beta es otra de las líneas de investigación que se han llevado a cabo durante los últimos años. Todo ello ha sido la base de una gran parte de las publicaciones científicas de nuestro grupo y fruto de este trabajo es el reconocimiento internacional en este campo. Este reconocimiento nos ha permitido participar en la redacción del documento de expertos del IPITA-TTS (International Pancreas and Islet Transplant Association-The Transplantation Society) sobre los tratamientos para el reemplazo de las células beta en la DM1, siendo el Dr. Montanya el único participante español (*Report from IPITA-TTS opinion leaders meeting on the future of B-cell replacement. Bartlett ST et al Transplantation 2016;100 Suppl 2: S1-44*).

Actualmente, y de forma habitual en diferentes proyectos llevados a cabo en nuestro laboratorio, utilizamos los islotes humanos para trasplantarlos y revertir la diabetes inducida a ratones, tal y como hemos publicado recientemente (*Nacher M, et al. Cell Transplant 2016;25(2):343-52*). El éxito del trasplante experimental con islotes humanos nos ha permitido confirmar su calidad y funcionalidad.

Mencionar también que en estos últimos años hemos puesto a punto la estrategia de expansión de células beta humanas como material de partida para obtener células productoras de insulina que sean trasplantables y se puedan utilizar en la terapia de la diabetes tipo 1. En base a ello, recientemente se han publicado dos artículos en revistas científicas:

Epithelial to Mesenchymal Transition in human endocrine islet cells. Moreno-Amador JL, Téllez N, Aloy-Reverté C, Semino C, Nacher M, Montanya E. PLOS One 2018, January 23.

Use of RGD-functionalized sandwich cultures to promote the redifferentiation of human pancreatic beta cells after in vitro expansion. Aloy-Reverté C, Moreno-Amador JL, Nacher M, Montanya E, Semino C. Tissue Eng Part A 2018;24:394-406.

## PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

### INTRODUCCIÓN.

#### **Antecedentes y estado actual del tema.**

Un aspecto central en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es la reducción del número de células beta de los islotes pancreáticos, responsables de la producción de insulina. Esta reducción en la masa de células beta es debida a una destrucción de tipo autoinmune. Las nuevas tecnologías como las insulinas de liberación lenta o las bombas de insulina han conseguido mejorar el control glicémico y la calidad de vida en los pacientes con DM1 pero no llegan a conseguir una regulación fisiológica de los niveles de glucosa en sangre. El trasplante de islotes ha demostrado que es capaz de reestablecer la normoglicemia en pacientes (5). Hay un importante desequilibrio entre el escaso número de donantes de órganos en relación al abundante número de personas con DM1 que podrían recibir el trasplante de islotes y ello restringe severamente su uso clínico (7,14). Por tanto, existe la necesidad de desarrollar estrategias capaces de generar células productoras de insulina en cantidades suficientemente importantes como para permitir que su trasplante tenga una amplia aplicación en el tratamiento de la DM1.

El cultivo y expansión *in vitro* de células beta aisladas a partir de islotes pancreáticos, representa una estrategia muy atractiva para la generación de células productoras de insulina. Sin embargo, la inducción de la proliferación de las células beta se asocia a una pérdida de la capacidad de producir insulina (10) debido a un proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), por el que las células de tipo epitelial (como las células beta) acaban transformándose en células de tipo mesenquimal. Es por ello, que las células beta que se han expandido no son aptas para el trasplante a pacientes. La rediferenciación de estas células expandidas y desdiferenciadas hacia células beta maduras, que sean capaces de nuevo de producir insulina, podría permitir la generación de una gran cantidad de células beta aptas para trasplante.

El proceso de EMT está favorecido por la disociación de las células del islote ya que quedan alterados los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular. En el páncreas, la matriz extracelular (ECM) es uno de los componentes más importantes del microambiente del islote y juega un importante papel en la supervivencia y diferenciación celular (4,11). La interacción de las células beta con las proteínas de la ECM induce señales que modifican la función de las células beta. Por tanto, el microambiente ó nicho de la célula afecta a su estado de diferenciación. Cuando las células son expandidas *in vitro*, los contactos célula-ECM se rompen y las células beta pierden su fenotipo, lo que conlleva la pérdida de la expresión del gen de la insulina (6).

Así pues, un importante aspecto para conseguir la rediferenciación de las células beta es que se cultiven en un microambiente que recree o simule las condiciones en que se encuentran en el páncreas. Por esta razón, las proteínas de ECM han sido ampliamente utilizadas para mejorar la supervivencia y diferenciación de las células beta *in vitro*. De todos modos, la gran mayoría de las proteínas de ECM que se han utilizado son de origen

animal o tumoral y, por ello, no pueden ser utilizadas para aplicaciones clínicas. Las nanofibras de péptidos autoensamblantes (SAPNF) son una red de nanofibras peptídicas de aproximadamente 10-20 nm de diámetro que forman un hidrogel con un tamaño de poro de 50-200 nm y con un contenido de agua superior al 99%. Este hidrogel forma un andamio en el que las células del islote pueden ser cultivadas en un ambiente realmente tridimensional con un tamaño de poro similar al de la ECM de origen natural. Además, estas nanofibras pueden estar unidas a péptidos sintéticos (péptidos instructivos) capaces de promover la diferenciación de varios tipos celulares (2,15). Se ha reportado como cultivos de islotes humanos cultivados en SAPNF muestran un incremento de la supervivencia y de la secreción de insulina (9). Nuestro grupo ha puesto a punto una plataforma con SAPNF en colaboración con el Dr. Carlos Semino del Institut Químic de Sarrià, y hemos demostrado su viabilidad en la inducción de la rediferenciación hacia células beta. En el proyecto que ahora presentamos nos proponemos diseñar una nueva plataforma con SAPNF unidas a péptidos instructivos más específicos que nos permitan una optimización del proceso de rediferenciación hacia células productoras de insulina.

### **Hipótesis del proyecto.**

La hipótesis de nuestro estudio es que las células beta expandidas *in vitro* (y que, por tanto, han perdido la capacidad de producir insulina) pueden ser parcialmente rediferenciadas hacia un fenotipo de célula beta mediante el reestablecimiento de los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular en un modelo de cultivo con un andamiaje sintético biomimético formado por SAPNF funcionalizado con secuencias específicas de ECM y en presencia de un cóctel de factores solubles que estimulen la rediferenciación.

### **Objetivo global del estudio.**

Inducir la rediferenciación de células beta humanas expandidas *in vitro*, utilizando nanofibras de péptidos autoensamblantes, hacia células productoras de insulina que podrían ser utilizadas en la terapia celular de la diabetes tipo 1.

### **Novedad del proyecto**

El uso de estructuras tridimensionales para el cultivo celular ha ganado protagonismo en los últimos años, pero ha sido poco desarrollado en el campo de la diabetes. Las SAPNF se han propuesto como un modelo válido para el cultivo de células de los islotes pancreáticos pero, hasta el momento, no se han realizado estudios previos con el objetivo de rediferenciar células endocrinas expandidas a partir de islotes humanos hacia células beta. Nuestros resultados preliminares (ver apartado siguiente) aportan un claro apoyo a la hipótesis de que las SAPNF funcionalizadas con motivos peptídicos específicos de proteínas de ECM y que están presentes en el nicho de las células beta, pueden estimular la rediferenciación hacia un fenotipo de célula beta. El cultivo en SAPNF es una plataforma sintética que no utiliza material animal no humano (xenogénico) o tumoral, por lo que es apta para su potencial aplicabilidad en la terapia celular de la DM1 y representa una prometedora estrategia para la generación de un número óptimo de células productoras de insulina que puedan ser destinadas a trasplante.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DESARROLLO DEL PROYECTO.

### Objetivos específicos.

1. Diseñar SAPNF funcionalizadas con péptidos sintéticos basados en la composición de proteínas de ECM y que forman parte del nicho de la célula beta.
2. Inducir y caracterizar la rediferenciación de las células expandidas *in vitro* a partir de islotes humanos mediante cultivo tridimensional en SAPNF funcionalizadas.

### Metodología utilizada.

1. *Diseño y preparación de las nanofibras de péptidos autoensamblantes (SAPNF)*. El andamiaje peptídico se formará mediante el autoensamblaje de los péptidos con el fin de formar un hidrogel que contendrá más del 99,5% de agua. El RAD16-I, el tipo de péptido autoensamblante utilizado en este proyecto, se convierte en un entramado de fibras muy delgadas de entre 5 y 7 nm y con un tamaño de poro entre 50 y 200 nm generando una matriz tridimensional de un tamaño de poro similar al de las matrices extracelulares de origen natural (13). Al RAD16-I se unen las secuencias biológicamente activas (los péptidos funcionales o instructivos) (3,15) que en nuestro proyecto serán específicos de proteínas de ECM. Para cada condición experimental, RAD16-I se mezclará (funcionalizará) con uno de los péptidos instructivos en proporción de un 90% de RAD y un 10% del péptido.

2. *Caracterización fisicoquímica de los péptidos instructivos*. Se utilizará Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) con el fin de determinar la estructura de los filamentos, la presencia de estructura de hoja beta mediante Dicroísmo Circular (CD) y las propiedades viscoelásticas del gel formado mediante reometría de placa-cono.

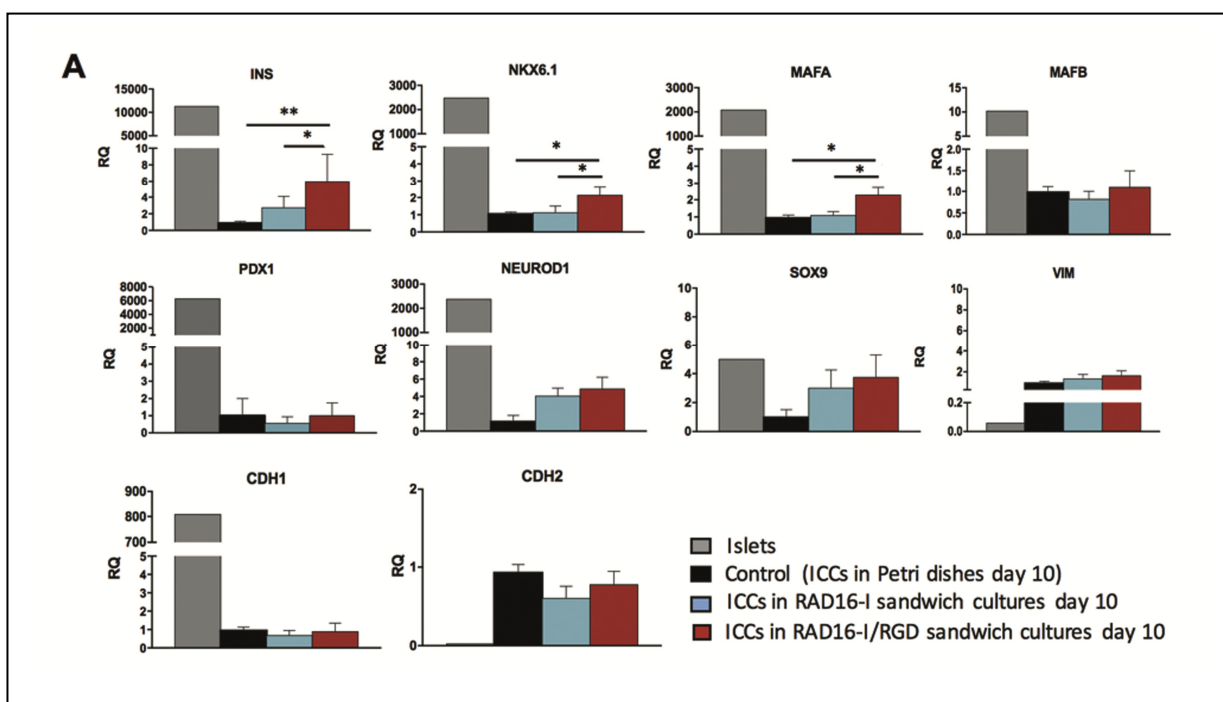
3. *Aislamiento de islotes pancreáticos humanos, dispersión en células aisladas y purificación de las células beta*. Los islotes humanos se aislarán a partir de páncreas de donantes multiorgánicos mediante digestión enzimática con colagenasa (12) y, posteriormente, se purificarán en un gradiente continuo de densidad. Las células de los islotes se dispersarán obteniéndose una preparación celular a partir de la que se purificarán las células endocrinas mediante separación magnética (Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS) (1). Nuestro equipo tiene acceso regular a páncreas de donantes multiorgánicos y dispone de amplia experiencia en aislamiento de islotes humanos (8).

4. *Expansión de las células endocrinas*. Las células endocrinas se incubarán en medio de cultivo CMRL1066 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS). En estas condiciones la mayoría de células se adhieren a la superficie de cultivo y forman una monocapa de células con una morfología epitelial. La población celular obtenida al cabo de unos 2 meses de cultivo se caracterizará en relación a: a) proliferación celular y apoptosis, b) expresión proteica (inmunofluorescencia) para insulina, glucagón, somatostatina, PP, CK19, alfa-amilasa y vimentina, c) expresión génica (RT-PCR cuantitativa) para insulina, glucagón, somatostatina, PP, CK19, alfa-amilasa, vimentina y factores de transcripción importantes para la función de la célula beta.

5. *Reagregación y rediferenciación de las células expandidas.* Las células expandidas se cultivarán a alta densidad en RAD16-I funcionalizado con los péptidos específicos de proteínas de ECM, ó bien, en RAD16-I sin funcionalizar (control). El medio de cultivo utilizado será CMRL1066 suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) y varios factores solubles. La población celular se caracterizará en relación a: a) proliferación celular y apoptosis, b) expresión proteica (inmunofluorescencia) para insulina, glucagón, somatostatina, PP, CK19, alfa-amilasa, vimentina, E-cadherina, N-cadherina y beta-catenina, c) expresión génica (RT-PCR cuantitativa) para insulina, glucagón, somatostatina, PP, CK19, alfa-amilasa, vimentina y algunos factores de transcripción importantes para la función de la célula beta, d) contenido de insulina y C-péptido y secreción de insulina estimulada por glucosa (2.8 mM y 20 mM).

### Resultados preliminares.

Nuestro grupo aisla rutinariamente islotes humanos procedentes de pancreas de donantes multiorgánicos. Los islotes son disociados y las células beta obtenidas son expandidas. En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se utilizó SAPNF (RAD16-I) unido al péptido instructivo RGD con el fin de inducir la rediferenciación de las células expandidas y reagregadas (*clusters*). Se observó un incremento de la expresión de genes específicos de la célula beta (insulina, Nkx6.1y MafA) después de 10 y 18 días de cultivo (Figura 1). En este estudio no se utilizó ningún factor adicional que pudiera inducir rediferenciación con el fin de comprobar que, efectivamente, el cultivo en RAD16-I y RAD16-I unido a péptido RGD eran los responsables del aumento obtenido en la expresión de los genes (Aloy-Reverté C, Moreno-Amador JL, Nacher M, Montanya E, Semino CE. *Use of RGD-functionalized sandwich cultures to promote redifferentiation of human pancreatic beta cells after in vitro expansion. Tissue Eng Part A 2018;24:394-406*).



**Figura 1.** Expresión génica de células beta expandidas y cultivadas en RAD16-I (*ICCs in RAD16-I sandwich cultures*), en RAD16-I unido a péptido 2RGD (*ICCs in RAD16-I/2RGD sandwich cultures*) y sin cultivar en RAD16-I (*Control*) a los 10 días de cultivo. *Ins*: insulina. *Nkx6.1*, *MafA*: marcadores de la célula beta madura. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$



## FACILIDADES DE LAS QUE SE VA A DISPONER PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO Y BIBLIOGRAFÍA.

Nuestro equipo dispone del acceso regular a páncreas humanos de donantes multiorgánicos procedentes del propio Hospital Universitari de Bellvitge. En la obtención de los páncreas participan el Servicio de Coordinación de Trasplante de Órganos así como el equipo de cirujanos del Servicio de Cirugía Digestiva de nuestro hospital. Se dispone de laboratorio para el aislamiento de islotes humanos y estabulario para animales inmunodeficientes. El resto de instalaciones y equipos necesarios están descritos en la sección Grupo de Investigación.

### Bibliografía.

1. Banerjee M, Otonkoski T. *Diabetologia* 2009;52:621-5.
2. Castells-Sala C, Recha-Sancho L, Lluçia-Valldeperas A, Soler-botija C, Bayes-Genis A, Semino CE. *Tissue Eng Part C* 2016;22:113-24.
3. Genové E, Shen C, Zhang S, Semino CE. *Biomaterials* 2005;26:3341-51.
4. Hammar E, Parnaud G, Bosco D, Perriraz N, Maedler K, Donath M, Rouiller DG, Halban PA. *Diabetes* 2004;53:2034-41.
5. Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, Eggerman TL, Alejandro R, Bellin MD, Chaloner K, Czarniecki CW, Goldstein JS, Hunsicker LG, Kaufman, DB, Korsgren O, Larsen CP, Luo X, Markmann JF, Naji A, Oberholzer J, Posselt AM, Rickels MR, ricordi C, Robien MA, Senior PA, Shapiro, AMJ, Stock PG, Turgeon NA. *Diabetes Care* 2016;39:1230-40.
6. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Rhodes C, Diaferia G, Montgomery AM. *Diabetes* 2006;55:2723-9.
7. Montanya E, Nacher M, Téllez N. En: *El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes. Monografías de la Sociedad Española de Diabetes. Sociedad Española de Diabetes* 2007.
8. Nacher M, Estil.les E, García A, Nadal B, Pairó M, García C, Secanella LI, Novials A, Montanya E. *Cell Transplant* 2016;25:343-52.
9. Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Okitsu T, Noguchi H, Matsumoto S, Takei J, Tanaka N, Kobayashi N. *Cell Transplant* 2008;17:111-9.
10. Ouziel-Yahalom L, Zalzman M, Anker-Kitai L, Knoller S, Bar Y, Glandt M, Herold K, Efrat S. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:291-8.
11. Parnaud G, Hammar E, Rouiller DG, Armanet M, Halban PA, Bosco D. *Diabetes* 2006;55:1413-20.
12. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. *Diabetes* 1988;37:413-20.
13. Semino CE, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. *Differentiation* 2003;71:262-70.
14. Shapiro AMJ. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16:627-31.
15. Wu J, Marí-Buyé N, Fernández Muiños T, Borrós S, Favia P, Semino CE. *J Nanotechnol* 2010;8:29.