

Rafael Ramírez Jiménez

# Modificación Superficial de Nanopartículas de Oro para Aplicaciones Biotecnológicas

Director/es

Martínez De La Fuente, Jesús  
Martín Rapún, Rafael

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

# MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Autor

Rafael Ramírez Jiménez

Director/es

Martínez De La Fuente, Jesús  
Martín Rapún, Rafael

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Química Orgánica

2022





# **Modificación Superficial de Nanopartículas de Oro para Aplicaciones Biotecnológicas**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Zaragoza

Rafael Ramírez Jiménez

Directores:

Jesús Martínez de la Fuente

Rafael Martín Rapún

Programa de Doctorado en Química Orgánica

Zaragoza, enero 2022



**Universidad**  
Zaragoza



D. Jesús Martínez de la Fuente, Profesor de Investigación del grupo de Biofuncionalización de Nanopartículas y Superficies del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón del CSIC/Universidad de Zaragoza, y D. Rafael Martín Rapún, Profesor Contratado Doctor del mismo grupo de investigación

INFORMAN:

Que Rafael Ramírez Jiménez graduado en Química y con título de Máster en Química Orgánica, ha realizado en el grupo de Biofuncionalización de Nanopartículas y Superficies del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón bajo su dirección el trabajo descrito en la presente memoria, que lleva por título “Modificación Superficial de Nanopartículas de Oro para Aplicaciones Biotecnológicas”, y que presenta para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, 16 de enero 2022

Prof. Jesús Martínez de la Fuente

Dr. Rafael Martín Rapún



*Esta tesis va dedicada a mi familia.  
Sin su apoyo, nada de esto hubiera sido  
posible. Abuelas, mamá, es también para  
ustedes, estén donde estén*



## ABREVIATURAS

<b>BAPL</b>	Banda de absorción de plasmón longitudinal
<b>BAPT</b>	Banda de absorción de plasmón transversal
<b>Cit</b>	Citrato sódico
<b>CTAB</b>	Cloruro de cetiltrimetilamonio
<b>DLS</b>	Dispersión de la luz dinámica
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>DPBS</b>	Disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
<b>EDC</b>	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EL4</b>	Célula de linfocitos T de ratón
<b>FA-PEG818</b>	HS-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -PEG(12)-COOH
<b>G-NPrs</b>	Nanoprismas grandes
<b>GSH</b>	Glutación
<b>ICP</b>	Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>ICP-AES</b>	Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>Jurkat</b>	Células inmortalizadas de linfocitos T humanos
<b>MadCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular de adresina mucosa
<b>MCF-7</b>	Cáncer de mama
<b>MES</b>	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
<b>miRNA</b>	microARN
<b>M-NPrs</b>	Nanoprismas medianos
<b>MS</b>	Esclerosis múltiple
<b>NCs</b>	Nanoclustérs
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccidimida

<b>NIR</b>	Espectro infrarrojo cercano
<b>NPrs</b>	Nanoprismas
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NRs</b>	Nanobastones
<b>NSs</b>	Nanoesferas
<b>PBS</b>	Disolución salina tamponada con fosfato
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEG458</b>	HS-PEG(8)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH
<b>PLL</b>	Poli-L-lisina
<b>P-NPrs</b>	Nanoprismas pequeños
<b>PTT</b>	Terapia fototérmica
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>QDs</b>	Puntos cuánticos
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SPR</b>	Resonancia del Plasmón de Superficie
<b>Sulfo-NHS</b>	<i>N</i> -hidroxisulfosuccidimida
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>Tiopronina</b>	<i>N</i> -(2-mercaptopropanoil)glicina
<b>TOAB</b>	Bromuro de tetraoctilamonio
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión vascular-1
<b>Vero</b>	Célula epitelial de riñón extraída de un mono verde africano
<b>vis</b>	Espectro visible



# RESUMEN

Las nanopartículas de oro presentan unas propiedades interesantes como una alta biocompatibilidad, baja toxicidad y sobretodo, excelentes propiedades ópticas. Todas estas propiedades hacen que estos materiales presenten un rango amplio de aplicaciones en diferentes áreas de investigación: detección de moléculas, diagnóstico, imagen y tratamiento de enfermedades, entre otras.

Para esas aplicaciones se dispone de dos elementos fundamentales. En primer lugar, se pueden preparar nanopartículas de oro de diversos tamaños y formas, características que tienen un impacto en sus propiedades ópticas y en su interacción con biomoléculas y células. En segundo lugar, la modificación superficial de las nanopartículas con biomoléculas permite adaptarlas a la aplicación concreta. El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en el diseño y la utilización de nanopartículas de oro para aplicaciones en diagnóstico y terapia.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de dos formas diferentes: nanoesferas y nanoprismas mediante la reducción del ácido tetracloroáurico. Se realizó una optimización de los métodos para la preparación de los diferentes materiales que no requieran el uso de sustancias tóxicas, y su posterior recubrimiento con polímeros de polietilenglicol (PEG). Los mejores candidatos se funcionalizaron con un intercalante de ADN mediante el acoplamiento de carbodiimida.

En segundo lugar, las nanopartículas funcionalizadas con el intercalante se probaron como amplificadores de la señal de biosensores ópticos basados en la tecnología de la Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR).

En tercer lugar, se estudiaron los sistemas de doxorrubicina unidos a las nanopartículas de oro como transportadores de fármacos. Se buscaron materiales que presentaban una carga alta de fármaco y que la nanopartícula de oro se dirigiera a la célula diana. Aquí se hizo hincapié en los problemas que nos encontraremos en la biocaracterización del material debido a posibles interferencias. Asimismo, se evaluó la viabilidad celular de dichas nanopartículas usando dos modelos celulares, uno de ellos es un modelo tumoral.

También, se mejoraron los métodos de purificación de nanoprismas para la eliminación de otras formas que se producen durante la síntesis. Esta metodología mejoró notablemente el rendimiento de los métodos actuales, evitando el uso de aditivos tóxicos. Se caracterizó este material y se comparó sus propiedades con nanoprismas purificados por gel de electroforesis. Estos materiales presentaban propiedades coloidales similares a los nanoprismas purificados por gel de electroforesis. Finalmente, se determinó el uso de estas nanopartículas como posible terapia fototérmica.

Finalmente, se abordó el uso de péptidos y peptidomiméticos como agentes vectorizantes que lleven las nanopartículas a una diana terapéutica concreta. Inicialmente se iniciaron los estudios *in vitro* con nanoesferas para evaluar los mejores péptidos y posteriormente se aplicó esta metodología en nanoprismas aprovechando la optimización de las condiciones que se han llevado a cabo a lo largo del trabajo.

# **ÍNDICE**

**ABREVIATURAS.....**

**RESUMEN .....**

## **Capítulo 1 Introducción**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 Nanotecnología .....	3
1.2 Nanopartículas de oro .....	5
1.2.1 Breve introducción histórica.....	5
1.2.2 Propiedades de las nanopartículas de oro.....	7
1.2.3 Síntesis de nanopartículas de oro .....	9
1.3 Química superficial .....	14
1.3.2 Formación de monocapas autoensambladas en nanoclúster de oro .....	17
1.3.3 Biofuncionalización de las nanopartículas de oro .....	22
<b>3.REFERENCIAS .....</b>	<b>27</b>

## **Capítulo 2 Síntesis y aplicación de nanopartículas de oro en biosensores**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
2.1 Síntesis de nanopartículas .....	47

2.1.1 Método de síntesis de las nanoesferas .....	47
2.1.2 Método de síntesis de los nanoclústers.....	59
2.1.3 Síntesis de los nanoprismas .....	61
2.2 Funcionalización de nanopartículas con un intercalante de ADN .....	73
2.2.1 Funcionalización de las nanoesferas .....	73
2.2.2. Funcionalización de los nanoclústers .....	84
2.2.3 Funcionalización de los nanoprismas .....	88
2.3 Uso de nanopartículas de oro como amplificadores de la señal de SPR .....	89
<b>3. CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>101</b>
<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>110</b>

### **Capítulo 3 Evaluación de nano-bio-interacciones de nanopartículas recubiertas con doxorrubicina**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>119</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
2.1 Caracterización de las nanopartículas .....	123
2.2 Interacción de la BSA con las nanopartículas .....	127
2.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno acelular ....	134
2.4 Actividad biológica de las nanoesferas con doxorrubicina ...	136
<b>3. CONCLUSIONES.....</b>	<b>144</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>146</b>

<b>5. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>155</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>155</b>

## **Capítulo 4 Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>163</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
2.1. Métodos de purificación de nanoprismas .....	171
2.1.1. Purificación de nanoprismas por filtración electroforética	171
2.1.2. Purificación de nanoprismas con glutatión (GSH).....	174
2.2. Caracterización de los nanoprismas tras la purificación.....	180
2.3. Estudios <i>in vitro</i> de los nanoprismas en células adherentes .	186
2.3.1. Citotoxicidad e internalización de los M-NPrs-GSH-PEG vs	
M-NPrs-PEG en células .....	186
2.3.2. Mejora de la internalización de los nanoprismas purificados	
con GSH .....	190
2.3.3 Estudios de hipertermia óptica con nanoprismas en células	
adherentes .....	194
<b>3. CONCLUSIONES.....</b>	<b>208</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>209</b>
<b>5. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>221</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>221</b>

## **Capítulo 5 Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>231</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>237</b>
2.1 Funcionalización de nanoesferas con péptidos .....	237
2.2 Experimentos <i>in vitro</i> de nanoesferas con células en suspensión .....	243
2.2.1 Selección de las líneas celulares.....	243
2.2.2 Estudios de internalización de nanoesferas funcionalizadas con péptidos en linfocitos T .....	246
2.3 Experimentos <i>in vitro</i> de nanoprismas con células en suspensión .....	252
2.3.1 Estudio de internalización de nanoprismas funcionalizados con péptidos en linfocitos T .....	252
2.3.2. Estudios de hipertermia óptica con nanoprismas en linfocitos T.....	255
<b>3. CONCLUSIONES.....</b>	<b>265</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>267</b>
<b>5. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>276</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>276</b>

## **Capítulo 6 Conclusiones**

<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>283</b>
-------------------------------------	------------

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## Capítulo 1



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Nanotecnología

En el ámbito de la ciencia de los materiales, la nanotecnología juega un papel cada vez más importante debido a las propiedades únicas que los nanomateriales poseen. Para considerar un material de tamaño “nano”, tiene que presentar al menos una de sus dimensiones entre 1 y 100 nm. En los materiales macroscópicos las propiedades físicas son independientes del tamaño. Sin embargo, al tener los nanomateriales una alta cantidad de átomos en su superficie, algunas de sus propiedades se ven afectadas por las particularidades de la interfase entre la superficie y el medio adyacente.<sup>1</sup> En consecuencia, la forma y el tamaño de los nanomateriales influye en sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo propiedades químicas, eléctricas, mecánicas, y ópticas. De este modo, justificamos el interés considerable que han atraído los nanomateriales.<sup>2-4</sup>

Las nanopartículas se pueden dividir en tres grupos principales: liposomas, poliméricas e inorgánicas. A continuación, haremos una breve descripción de algunos de los materiales más importantes (Figura 1):

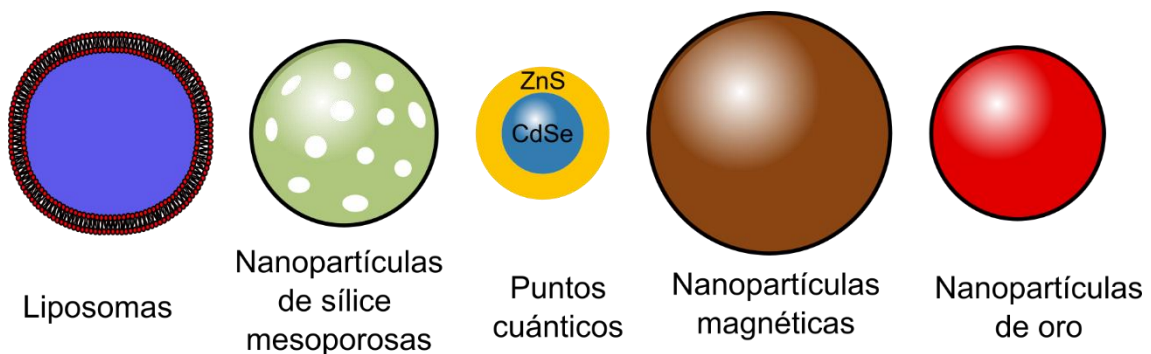


Figura 1. Algunos tipos de nanopartículas. Cada tipo de nanopartícula agrupa múltiples subtipos.

## Capítulo 1

- **Liposomas:** son vesículas esféricas (50-100 nm)<sup>5</sup> que consisten en una o dos bicapas de formadas por colesterol y fosfolípidos naturales o sintéticos. La naturaleza anfifílica de los liposomas les permiten ser usados como transportadores de fármacos: los compuestos hidrófobos se incrustan en la doble capa lipídica, y los materiales hidrófilos se retienen en el compartimento acuoso en el interior. Entre las múltiples ventajas de los liposomas destacamos su carácter biodegradable y la liberación prolongada del fármaco.<sup>6</sup>
- **Nanopartículas poliméricas:** pueden ser sintetizadas a partir de materiales naturales o sintéticos como monómeros o polímeros preformados generando un grupo amplio de estructuras y características. Estas nanopartículas se emplean para facilitar el control preciso de las características de la nanopartícula. Además, suelen ser un buenos transportadores de fármacos porque las nanopartículas poliméricas pueden ser biocompatibles y tienen parámetros de formulación simples y bien definidos.<sup>7</sup>
- **Nanotubos de carbono:** pertenecen a la familia de los fullerenos, y están formados por láminas de grafito coaxiales enrollado como un cilindro. Estas estructuras pueden obtenerse como nanotubos monopared (una lámina de grafito) o multipared (varias láminas de grafito coaxiales). Los diámetros pueden variar entre 1,5 y 100 nm. Estos materiales presentan excelentes propiedades eléctricas y son conductores eficientes del calor. Debido a su naturaleza de semiconductor, los nanotubos se utilizan a menudo en biosensores. Los nanotubos se pueden solubilizar en agua mediante funcionalización de la superficie. Encontramos ejemplos del uso de estos materiales como transportadores de fármacos y en estructuras para reparación de tejidos.<sup>2,8</sup>

- Los puntos cuánticos o QDs son nanopartículas fluorescentes basadas en semiconductores (2-10 nm). Normalmente están formadas por compuestos binarios de elementos de los grupos II y VI del sistema periódico (CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS y ZnSe) o III y V (GaAs, GaN, InP y InAs). Los QDs son fotoestables y mediante la modificación de su tamaño y composición, se pueden ajustar su espectro de emisión y rendimiento cuántico. Estas características hacen a los QDs excelentes agentes de imagen y marcadores para bioensayos.<sup>9</sup>
- Nanopartículas de otros materiales inorgánicos como el oro, óxido de hierro y sílice han sido preparadas y utilizadas en diferentes tamaños, estructuras y geometrías. Cada tipo de estas nanopartículas tienen propiedades físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas únicas debido a las propiedades intrínsecas del material.<sup>10</sup>

En esta tesis nos centraremos en el uso de nanopartículas de oro por sus interesantes propiedades y amplio rango de aplicaciones en diferentes áreas de investigación. Entre estas destacamos la detección de moléculas<sup>11,12</sup>, el diagnóstico<sup>13,14</sup>, la imagen<sup>15,16</sup> y el tratamiento.<sup>17-19</sup>

## 1.2 Nanopartículas de oro

### 1.2.1 Breve introducción histórica

Las propiedades del oro son muy diferentes a otros elementos de su mismo grupo de la tabla periódica. Puesto que se trata de un metal poco abundante pero que se encuentra en estado elemental en la naturaleza, se le denomina metal noble. Asimismo es considerado un símbolo de inmortalidad en culturas ancestrales.<sup>20</sup>

## Capítulo 1

Las nanopartículas de oro son sistemas coloidales (del griego, *Kola*, adhesivo) en el que una sustancia forma nanopartículas dispersas en el seno de un medio.<sup>21</sup> El primer ejemplo destacable de sistema coloidal de oro lo encontramos en la copa de Licurgo que se remonta al siglo V d.C (Figura 2). Si la copa se ilumina desde fuera, toma un color verde. Cuando se alumbra desde dentro de ella, el color cambia a rojo, y solo el rey aparece de color violeta. Se descubrió que este dicroísmo se debe a la presencia de nanopartículas de Ag (66,2%), Au (31,2%) y Cu (2,6%), que presentan un tamaño entre 20 y 40 nm.<sup>22</sup>



Figura 2. Copa de Licurgo.<sup>23</sup>

Para encontrar el primer ejemplo registrado de síntesis de nanopartículas de oro nos tenemos que remontar a 1857, cuando Faraday preparó nanopartículas de oro mediante la reducción de una disolución de ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) usando fósforo en sulfuro de carbono y describió sus propiedades.<sup>24</sup> Asimismo, Faraday demostró que en sus disoluciones coloidales el oro está en estado metálico y que la gelatina y otros compuestos moleculares tienen un efecto protector.

### 1.2.2 Propiedades de las nanopartículas de oro

Además de tener una alta proporción de superficie con respecto al volumen, las nanopartículas de oro destacan por su excelente biocompatibilidad, baja toxicidad y, sobre todo, por sus propiedades ópticas, debidas al efecto de resonancia del plasmón de superficie (SPR). El efecto SPR se debe a la interacción de un campo electromagnético de luz incidente con los electrones de la banda de conducción de la superficie del metal, que genera la oscilación colectiva y coherente de los electrones de la superficie (Figura 3). Las nanopartículas son de menor tamaño que la longitud de onda de la radiación de excitación lo que produce un plasmón localizado de superficie y la extinción de radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda de resonancia (LSPR). En las nanopartículas de oro la posición e intensidad de las bandas LSPR dependen sobre todo de la forma y el tamaño de la nanopartícula. Se pueden encontrar en el espectro visible como en el caso de las nanoesferas (NSs), o en el espectro visible e infrarrojo cercano (vis-NIR) para las nanopartículas anisótropas (nanoprismas y nanobastones). En el caso de las nanoesferas se observa una única banda de LSPR al tratarse de nanopartículas isotropas (Figura 3, A-B). Por otro lado, las nanopartículas anisótropas presentan dos tipos de banda de absorción: la banda de absorción de plasmón longitudinal (BAPL) y la banda de absorción de plasmón transversal (BAPT), correspondientes a dos modos de oscilación de los electrones, a lo largo de los ejes largo y corto para el caso de los nanobastones (Figura 3, C-D).

## Capítulo 1

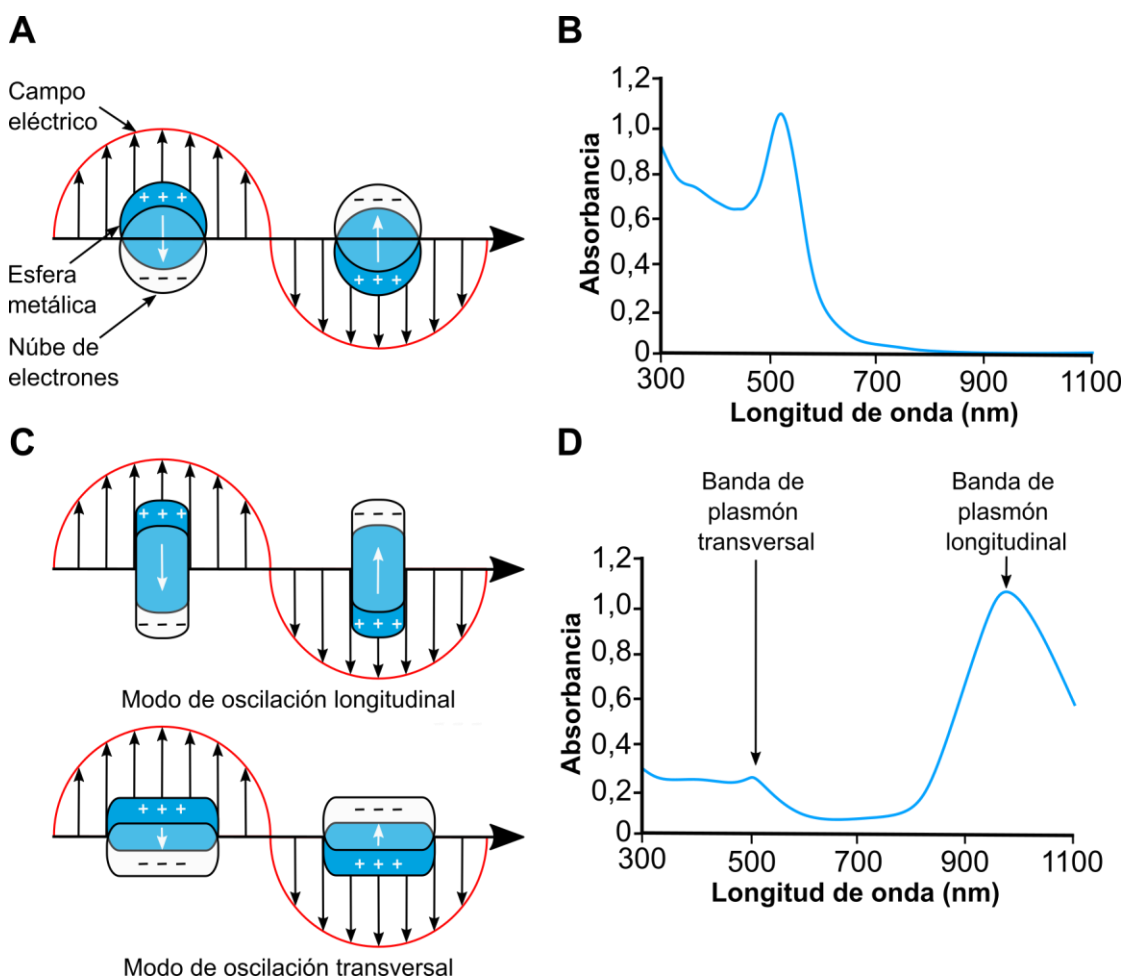


Figura 3. Ilustración esquemática de la excitación de la LSPR para las nanoesferas (A-B) y para los nanobastones (C-D) donde se observa la presencia de la banda de absorción de plasmón longitudinal (BAPL) y la banda de absorción de plasmón transversal (BAPT). Está adaptado de la ref 25.

Las dispersiones de NPs de oro esféricas en agua exhiben una gran variedad de colores – marrón, naranja, rojo y violeta – a medida que el diámetro del núcleo metálico aumenta de 1 a 100 nm (Figura 4). A partir de 10 nm, muestran una banda LSPR en el intervalo de 500 a 550 nm, cuya posición depende principalmente del tamaño.<sup>26</sup> Aunque el tamaño de la NP esférica de oro es el factor más importante, otros factores como el disolvente, el recubrimiento, la carga de la nanopartícula, la temperatura del medio o la proximidad a otras nanopartículas también influyen en la posición de la banda LSPR. La agregación de las nanopartículas esféricas da como resultado un cambio significativo al rojo de la frecuencia LSPR, un

ensanchamiento de la banda y, en consecuencia, un cambio del color de la solución de rojo a azul.

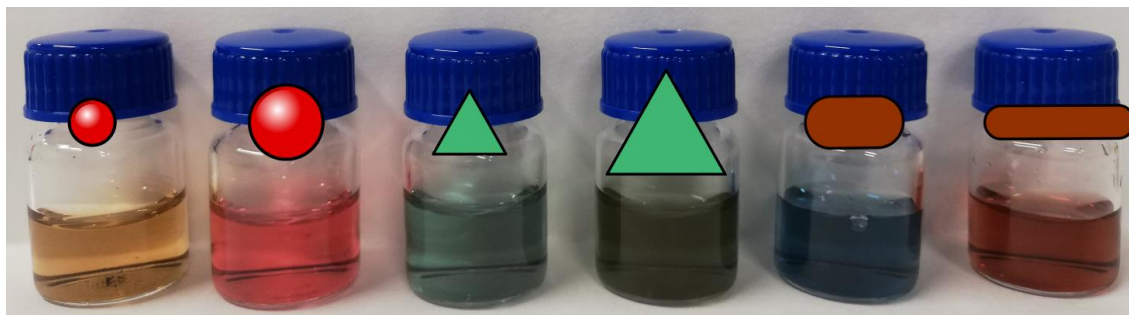


Figura 4. Suspensión de nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños que han sido preparados a lo largo de la tesis doctoral. De izquierda a derecha: nanoclúster de 3 nm, nanoesferas de 14 nm, nanoprismas triangulares de 125 nm de lado, nanoprismas triangulares de 205 nm de lado, nanocilindros de 45 nm x 19 nm y nanocilindros de 77 nm x 12 nm.

Una de las propiedades más interesantes del LSPR es la conversión de la energía del campo electromagnético de la luz en calor debido a los procesos de relajación electrón-electrón y electrón-fotón.<sup>27</sup> Esta rápida conversión fototérmica puede utilizarse para calentar localmente el entorno de la nanopartícula empleando una fuente de luz con una frecuencia que solape con la absorción LSPR de la nanopartícula.<sup>28</sup> Esta propiedad se puede aprovechar para usar las nanopartículas en biosensores<sup>29</sup> o en terapia<sup>30-33</sup>. En el Capítulo 5 y Capítulo 6 se aplicarán las nanopartículas para posible terapia fototérmica haciendo estudios *in vitro*.

### 1.2.3 Síntesis de nanopartículas de oro

La preparación de nanopartículas de oro se puede afrontar desde dos estrategias: *top-down* y *bottom-up*. En los procedimientos de *top-down*, se parte del material en estado sólido y se rompe para generar NPs de

## Capítulo 1

dimensiones deseadas. Por ejemplo, el oro se puede irradiar con iones en aire<sup>34</sup> o mediante un arco eléctrico en agua.<sup>35</sup> En este caso, la formación de la nanopartícula está controlada por una matriz o patrón. Sin embargo, el control de la forma y tamaño de las nanopartículas que se obtienen mediante estos procedimientos es muy limitado. Por el contrario, la estrategia de *bottom-up*, produce la formación de la nanopartícula a partir de moléculas que requieren una reducción química o biológica. Los métodos de reducción implican dos pasos: nucleación y crecimiento sucesivo. Cuando la nucleación y el crecimiento sucesivo se completan en el mismo proceso, se denomina síntesis *in situ*. Este tipo de síntesis es la más apropiada para la preparación de nanopartículas isótropas como nanoesferas o cuasi-esferas. Por otro lado, si los procesos de nucleación y crecimiento ocurren en varias etapas, se denomina crecimiento por semillas.<sup>36</sup> Esta metodología es la más habitual en la preparación de nanopartículas de oro de tamaños y formas diferentes a las esféricas.

Los métodos *in situ* más destacables son los de reducción química. En ellos se utilizan dos tipos de sustancias. El agente reductor – citrato de sodio y borohidruro de sodio entre otros – proporciona electrones para reducir el oro presente en sales a oro metálico. El agente estabilizante – tioles, aminas, polímeros y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) entre otros – impiden la agregación de las nanopartículas mediante la formación de una capa protectora sobre la superficie y así las mantienen coloidalmente dispersas. Algunas sustancias pueden actuar como agente reductor y estabilizante, como es el caso del citrato en el método de Turkevich.<sup>37</sup> En este método las nanopartículas de oro se preparan mediante la reducción *in situ* de  $\text{HAuCl}_4$  con citrato. Para llevar a cabo esta reacción se necesita temperatura de reflujo y una agitación vigorosa. Esta metodología fue mejorada posteriormente por Frens<sup>38</sup> para obtener tamaños de entre 10 y 150 nm de diámetro mediante el



control de la proporción de oro y citrato sódico. Sin embargo, las nanopartículas mayores de 30 nm son siempre polidispersas.

El mecanismo de la reacción de Turkevich ha sido estudiado extensamente llegando a la conclusión de que el estabilizante real de las nanopartículas es la dicarboxiacetona que proviene de la oxidación del citrato. Se han realizado muchos cambios para mejorar la síntesis como modificar el pH, controlar la temperatura de reacción, irradiar con luz fluorescente o utilizar ultrasonidos de alta potencia.<sup>39</sup> A pesar de ello, la baja velocidad de la reducción de Au(III) con citrato hace que el método de Turkevich-Frens no sea adecuado para la obtención de clústeres de oro. La adición de borohidruro de sodio en el protocolo permite la producción de AuNP de 4 nm pero con una baja estabilidad coloidal.<sup>40</sup> La utilización de óxido de deuterio como disolvente en lugar de agua también permite obtener AuNPs de menor tamaño al aumentar el poder reductor del citrato<sup>41</sup>.

Otra síntesis destacada, es el método de Brust-Schiffrin, que permite preparar *in situ* nanoclústers estabilizados con tiolatos.<sup>42</sup> La sal de oro se transfiere a una fase orgánica (tolueno) usando un agente de transferencia de fase, el bromuro de tetraoctilamonio (TOAB). Posteriormente, la reducción se realiza con borohidruro sódico en presencia de un compuesto con el grupo tiol como 1-dodecanotiol u otro alcanotiol. Las nanopartículas se obtienen con tamaños comprendidos entre 2 y 5 nm de diámetro. Sin embargo, para aplicaciones biomédicas tiene la desventaja de que se requiere el uso de disolventes orgánicos y pasos posteriores para transferir las nanopartículas a agua.

La síntesis de las nanopartículas no esféricas o anisótropas suele requerir de métodos de crecimiento mediados por semillas, que suelen ser facilitados por surfactantes tales como el CTAB, dodecilsulfato de sodio (SDS) y polivinilpirrolidona (PVP). Esta metodología se ha utilizado para

## Capítulo 1

preparar diferentes formas de nanopartículas como nanobastones,<sup>43,44</sup> bipirámides,<sup>45</sup> nanoprismas<sup>46,47</sup> y nanopartículas pseudoesféricas.<sup>48</sup>

La metodología de semillas sigue dos pasos principales. Primero se forman las semillas mediante la reducción del precursor de oro con un agente reductor fuerte como el borohidruro de sodio. El objetivo que se consigue en esta etapa es la formación de numerosos núcleos, uniformes en tamaño y forma para facilitar que las nanopartículas finales se obtengan con baja polidispersidad. En la segunda etapa las semillas se añaden a una disolución de sal de oro en presencia de un reductor más débil como el ácido ascórbico, tiosulfato de sodio o tioles, para conseguir un mejor control del crecimiento. Además, en la disolución están presentes otros aditivos, como surfactantes y haluros, que tienden a unirse a las caras cristalinas más energéticas –  $\{111\} < \{110\} < \{100\}$  – de manera que el crecimiento se produce en las caras restantes. Se consigue así selectividad de forma.

En la síntesis de nanobastones, el CTAB se une preferiblemente a la cara  $\{100\}$ <sup>49</sup> de las semillas y reduce el crecimiento por este lado. El crecimiento de las partículas está gobernado por la difusión de los átomos de oro hacia la superficie. Asimismo, la monodispersidad y el tamaño de los nanobastones dependen de otros parámetros de la síntesis como la temperatura, pH, y otros aditivos como la plata o el yodo. En el caso de los átomos de plata, se depositan en las caras  $\{110\}$ .

Los haluros también influyen en el crecimiento en los métodos por semillas. Se ha demostrado que afectan a la morfología de las micelas que forma el CTAB y, en consecuencia, modifican la adsorción a la superficie. Con la adición de una pequeña cantidad de anión yoduro en la disolución de crecimiento, se bloquean las caras  $\{111\}$  en comparación con otras caras cristalográficas. En consecuencia, el crecimiento de las nanopartículas

transcurre por los planos {100} y {110} y se forman nanoprismas triangulares.<sup>50,51</sup>

No obstante, la aplicación de los nanoprismas de oro preparados por la metodología anteriormente expuesta tiene como desventaja el uso de surfactantes como el CTAB. Aunque permiten controlar la forma y el tamaño de los nanomateriales, son difíciles de eliminar para una posterior funcionalización. Además se ha descrito que el CTAB es tóxico en organismos vivos.<sup>52</sup> Aunque esta última característica no es relevante para muchas aplicaciones, sí que tiene relevancia si se quiere usar los AuNPrs en contacto con tejidos vivos, por ejemplo en terapia.

Para preparar NPRs de oro sin utilizar CTAB generalmente se emplean condiciones reductoras suaves en combinación con un agente director de forma que puede ser otro tensioactivo, polímeros sintéticos<sup>53–58</sup> o naturales,<sup>59</sup> cristales líquidos<sup>60</sup> o haluros de metales alcalinos.<sup>50</sup> En estos métodos la selectividad de forma es menor y se obtienen nanoesferas como subproducto. La separación de nanoprismas y nanoesferas es laboriosa y hasta ahora no se han descrito métodos eficaces escalables para obtener nanoprismas puros. Así, nuestro grupo de investigación desarrolló un método para la síntesis de nanoprismas que evitaba el uso de CTAB.<sup>61</sup> En este método, el precursor de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ), se reduce con tiosulfato de sodio, que actúa como reductor suave. Además, se ha demostrado que el tiosulfato actúa también como agente director de la forma, facilitando el crecimiento de la nanopartícula principalmente en la zona multimaclada y altamente facetada de la estructura, que está formada predominantemente por caras {110} y {100}.<sup>62</sup> En esta síntesis se producen nanoprismas totalmente biocompatibles, muy adecuados tanto para aplicaciones en diagnóstico como en terapia, pero sería deseable desarrollar un método escalable para separar las nanoesferas de los nanoprismas

## Capítulo 1

### 1.3 Química superficial

#### 1.3.1 Recubrimiento de superficies de oro con tioles

La funcionalización de la superficie de las nanopartículas de oro es esencial para darles funcionalidad, estabilidad y biocompatibilidad. Tras la síntesis de las nanopartículas de oro, el núcleo suele estar recubierto con moléculas que se encuentran unidas débilmente a las nanopartículas por lo que los cambios de las condiciones del medio como el pH o la fuerza iónica pueden afectar a la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Por ello, la modificación de la superficie de las nanopartículas con diferentes moléculas, polímeros o biomoléculas cumple una serie de funciones:<sup>63</sup>

- Mantener las nanopartículas dispersas, aunque se produzcan cambios en las condiciones del medio como el pH o la fuerza iónica.
- Reducir la adherencia de biomoléculas en medio fisiológico.
- Aportar un grupo funcional sobre la superficie para una derivatización posterior.
- Incrementar la solubilidad de la NP en diferentes disolventes para ampliar sus posibles aplicaciones.
- Modificar las propiedades fisicoquímicas de la nanopartícula tales como las propiedades electrónicas y ópticas.
- Mejorar su capacidad de interacción con moléculas diana para aplicaciones en biosensores o tratamiento.
- Reducir la toxicidad de la nanopartícula y mejorar su biodisponibilidad en aplicaciones *in vitro* o *in vivo*.

Cabe destacar que todas las aplicaciones que se utilizan en la tesis requieren que las nanopartículas sean solubles en agua, por lo que solo nos centraremos en estos procesos. Dentro de los procesos más importantes de estabilización se encuentran: intercambio de ligando, recubrimiento y

encapsulación con polímeros. En el caso de las nanopartículas de oro, el intercambio juega un papel importante debido a la facilidad de retirar moléculas débilmente unidas a la superficie de oro y recubrir la superficie con un ligando para modificar las propiedades del material. La reacción de intercambio estará influenciada por la afinidad del ligando a la superficie, y la abundancia relativa del ligando entrante y el ligando saliente.

La afinidad del ligando a la superficie de la nanopartícula se puede explicar a través de la teoría de ácido y base duro-blando, también conocida como concepto ácido-base de Pearson, que amplía el concepto de ácido y base de Lewis que fallaba en dar una escala definitiva y uniforme para medir la fuerza relativa de ácidos y bases. El carácter duro de un ácido o una base se debe a que estén formados por átomos pequeños y poco polarizables. Por el contrario, átomos o grupos grandes y polarizables se asocian a un carácter blando del ácido o de la base. Tiolatos y átomos de oro oxidados son bases y ácidos blandos respectivamente, por lo que son elementos perfectos para interaccionar entre sí. Por el contrario, bases duras como ligandos que contengan oxígeno como los carboxilatos, muestran una baja afinidad por la superficie blanda de las AuNPs, pero se unen fuertemente a superficies más duras como CdSe.<sup>1</sup>

Dentro de los grupos funcionales blandos que se pueden unir a la superficie de oro se encuentran los tioles (-SH) y las fosfinas (PR<sub>3</sub>).<sup>64</sup> Para nanopartículas de oro se suele trabajar con moléculas o polímeros que contengan el grupo funcional tiol puesto que forma un enlace covalente con los átomos superficiales de la nanopartícula. Tioles simples pueden ser intercambiados por tioles más complejos.<sup>65</sup>

Las interacciones de moléculas que contengan grupos tioles con superficies de oro dan lugar a la formación de monocapas autoensambladas (SAM por sus siglas en inglés). El término de autoensamblaje se define como

## Capítulo 1

la formación espontánea de estructuras secundarias más complejas que reducen sus grados de libertad.<sup>66</sup> Un ejemplo de autoensamblaje en la naturaleza ocurre en la formación de la membrana lipídica de las células. En el caso de las SAM, son sistemas más simples, lo que les confiere la estabilidad y funcionalidad deseada a los materiales.<sup>67</sup> El estudio de SAM nos permite entender lo que ocurre en la interfase orgánica-inorgánica y tener un punto de partida para describir los ligandos unidos a nanomateriales.

Para los primeros estudios superficiales en metales, se estudiaron alcanotioles para formar autoensamblados, variando el tamaño de la cadena desde 1 hasta 20 carbonos durante los últimos 30 años,<sup>68</sup> centrándose estos trabajos en sustratos de Au(111). Las razones por las que el oro se usa como estándar en los estudios superficiales, ya fueron planteadas por el grupo de Love<sup>69</sup>, quien afirma que el oro es la superficie más estudiada históricamente (aunque en ciertas aplicaciones no suele ser el mejor sustrato) pues permite formar buenos autoensamblados.

Con respecto a una superficie (111), los grupos tioles se colocan siguiendo la estructura de monocapa  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}R30^\circ$  con una cobertura de  $1/3$  con respecto a los sitios de la superficie de oro (111). Como resultado se estima un área ocupada de  $21,6 \text{ \AA}^2$  por molécula (Figura 5).<sup>70</sup>

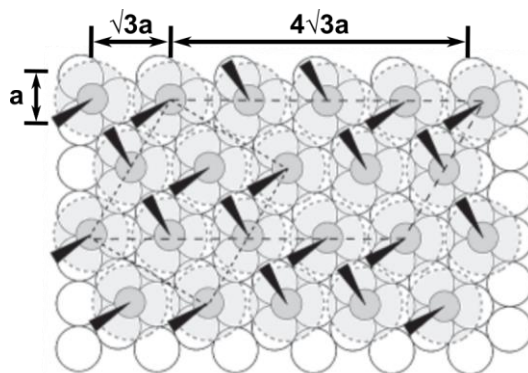


Figura 5. Disposición  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}R30^\circ$  de decanotioles en la superficie Au(111) cuando se consigue el máximo recubrimiento ( $a = 2,88 \text{ \AA}$ ).<sup>69</sup>

### 1.3.2 Formación de monocapas autoensambladas en nanoclúster de oro

A diferencia de las superficies planas, los nanoclústers (NCs) o nanoesferas (NSs) están rodeados de vértices y aristas, que facilitan la coordinación de un número mayor de cadenas tioladas por la reducción de interacciones estéricas entre las cadenas (Figura 6, A). Como resultado, AuNCs de 3 nm de diámetro permiten tener una densidad superficial de cadenas de ligando de  $6 \text{ nm}^{-2}$ , en comparación a los  $4,6 \text{ nm}^{-2}$  en una superficie de Au(111).

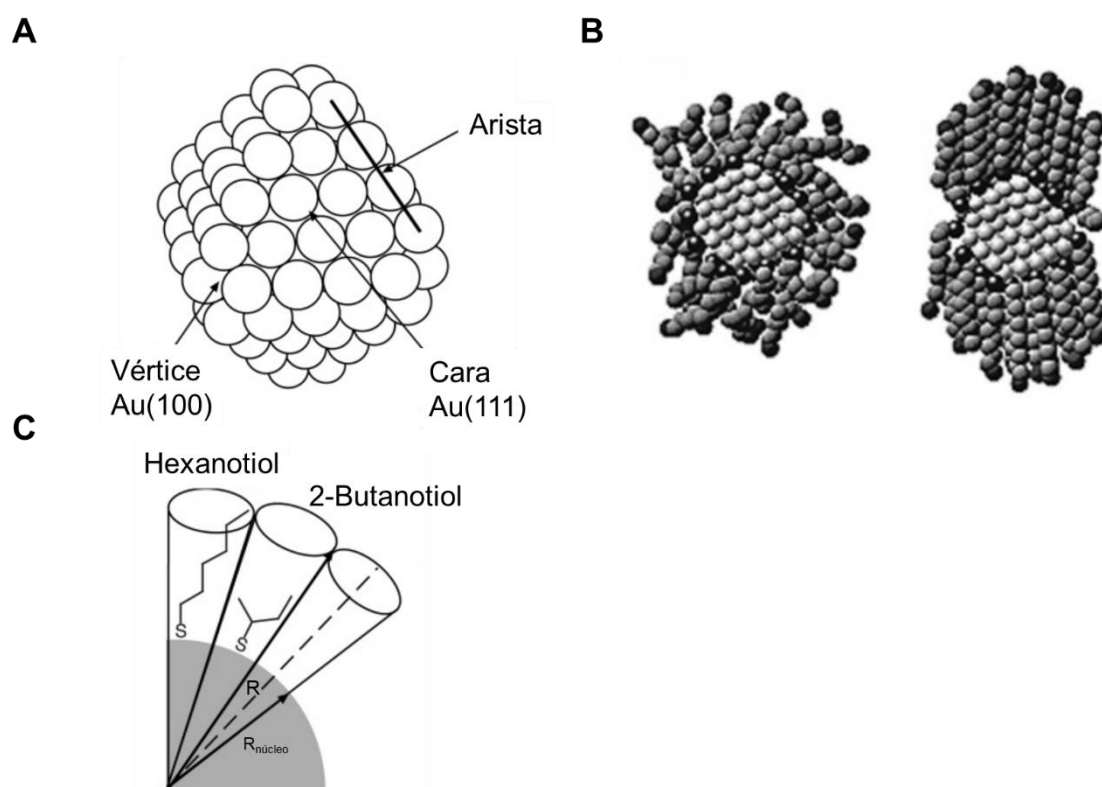


Figura 6. Modelo de nanoclúster Au<sub>140</sub> con geometría octaédrica truncada (A). Imágenes de las configuraciones en el equilibrio de dodecanotiol pasivando Au<sub>140</sub> obtenidas mediante simulaciones de dinámica molecular a 350 K (izquierda) y 200 K (derecha)(B). Diagrama esquemático de un nanocluster de oro (Radio = R<sub>núcleo</sub>) recubierto con alcanotiolatos lineales y ramificados, y R es la distancia radial (C). Figuras traducidas de ref 69.

## Capítulo 1

Como hemos visto en el apartado de síntesis, el uso de tioles como estabilizantes en la síntesis limita el tamaño de los materiales obtenidos ( $<5$  nm). Esto es consecuencia de los equilibrios dinámicos en la superficie del material, la cantidad de surfactante en la superficie de la nanopartícula va a depender de las velocidades de adsorción y desorción del surfactante. Los ligandos que estén quimisorbidos a la superficie de la nanopartícula serán menos propensos a procesos de desorción que las especies unidas por fisisorción. Por ejemplo, los grupos tioles están quimisorbidos a la superficie de la nanopartícula, su desorción será más lenta y estaremos obteniendo nanoclústers con estos métodos. Por el contrario, la mayoría de los surfactantes u otras moléculas pequeñas se unen a la superficie a través de interacciones no covalentes como enlaces de van der Waals o enlaces iónicos. Estas interacciones pueden afectar en el control cinético de la nucleación de las nanopartículas y crecimiento. Este proceso dinámico permite el control sobre el tamaño y la forma de los nanocristales.<sup>71</sup>

Cabe destacar que se considera que las nanopartículas de oro mayores a 8 nm pueden tener una estructura de octaedro truncado o cubooctaedro dependiendo del número de átomos de oro. Estas formas presentan 8 caras  $\{111\}$  y seis caras  $\{100\}$  (Figura 6, A).<sup>69</sup> Para simplificar los cálculos, se utilizarán modelos simples de superficie de estas nanopartículas. En esta tesis doctoral, se considera la forma de una esfera en el cálculo de superficie y volumen de nanoesferas y nanoclústers de oro.

La estabilización de la superficie de la nanopartícula estará influenciada por varios factores como empaquetamiento, carga y conformación del polímero en la superficie. Estos factores dependerán de tres regiones básicas del ligando: grupo principal unido a la nanopartícula, la cadena principal, y el grupo terminal específico (Figura 7). La densidad del



ligando está limitada por los grupos funcionales que pueden ocupar la superficie.

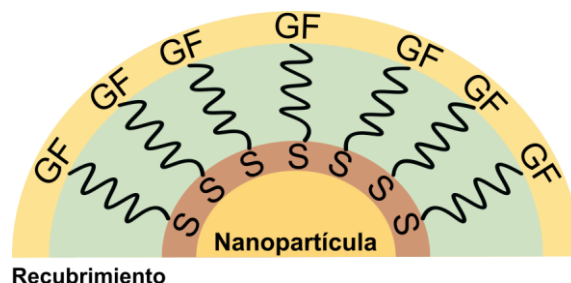


Figura 7. Representación de las tres regiones importantes del recubrimiento de la nanopartícula: grupo funcional (GF) unido a la nanopartícula, región intramolecular y grupo terminal

La segunda región es la porción intramolecular entre ambos extremos del polímero, esta región está afectada por las fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas que, junto a los efectos estéricos, le proporcionan un empaquetamiento eficiente a la monocapa y contribuyen a estabilizar la nanopartícula. La estabilización es mayor si se aumenta la longitud de cadena. Uno de los polímeros más utilizados para la estabilización de nanopartículas es el polietilenglicol (PEG) que incrementa la solubilidad y el tiempo de circulación de las nanopartículas en la sangre.<sup>72</sup> A consecuencia de esto, se han motivado estudios teóricos y experimentales del comportamiento del PEG unido en diferentes superficies.<sup>73</sup> Muchos autores aceptan la teoría de Alexander y de Gennes,<sup>74</sup> que define dos modelos para los polímeros unidos a una superficie. Si hay una baja densidad de recubrimiento, las cadenas se comportan más como cadenas aisladas en disolución, en consecuencia, forman un hemisferio, también conocido como champiñón cuyo tamaño viene dado por el radio de Flory (Figura 8).<sup>a</sup> Por

---

<sup>a</sup>  $R_F = \alpha \cdot N^{3/5}$  donde  $N$  es el grado de polimerización y  $\alpha$  es el tamaño del monómero para el PEG  $\alpha = 3,5 \text{ \AA}$ .

## Capítulo 1

otro lado, cuando existe una densidad alta de recubrimiento, el polímero se configura en un sistema tipo cepillo.

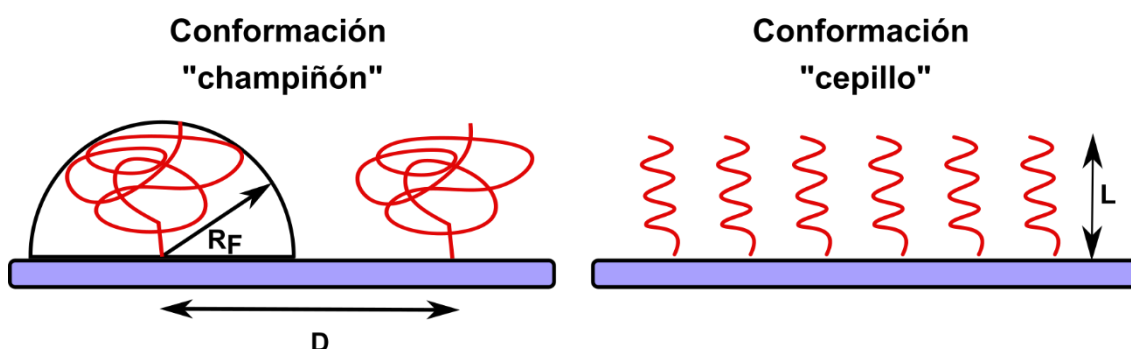


Figura 8. Los polímeros sobre la superficie pueden presentar dos conformaciones principalmente: champiñón o cepillo.

Finalmente, se encuentra un grupo terminal en contacto con la disolución confiriéndole estabilidad mediante cargas positivas (amonio cuaternario) o cargas negativas (carboxilo). Pequeños cambios en el grupo terminal pueden ser suficientes para cambiar las propiedades físicas y químicas de la capa.<sup>66,75</sup> Asimismo, este grupo permitirá generar funcionalidad en la nanopartícula para unirla a diferentes moléculas o biomoléculas a través de interacciones débiles o enlaces covalentes.<sup>69,76</sup>

La fuerza efectiva de la unión del ligando a la superficie puede aumentar significativamente debido al efecto de la quelación, mediante el uso de ligando que presente más de un grupo que se una a la superficie. Ejemplos de ligandos quelantes se encuentran en los que contienen carboxilatos como la dopamina y ditiolos como el ácido lipoico.<sup>77</sup> Por otro lado, se ha demostrado que la hidrofobicidad de polímeros cerca al enlace tiol mejora la estabilidad de la nanopartícula debido a un empaquetamiento más denso sobre la superficie. Estos factores pueden modificar, en última instancia, la cantidad de proteínas que se unen a la nanopartícula.

En el trabajo del grupo de Walkey (Figura 9) <sup>78</sup> se estudió por dispersión dinámica de la luz (DLS) cómo cambia el volumen ocupado por cadenas de PEG. Por un lado, se encontró que la densidad del recubrimiento crece al disminuir el tamaño del polímero. Por otro lado, el aumento de curvatura de la nanopartícula frustra las interacciones entre las cadenas de PEG y empeora el recubrimiento. Finalmente, los autores observaron que si el recubrimiento con PEG no es eficaz, se une un mayor número de proteínas a la superficie y las nanopartículas son más fácilmente absorbidas por macrófagos.

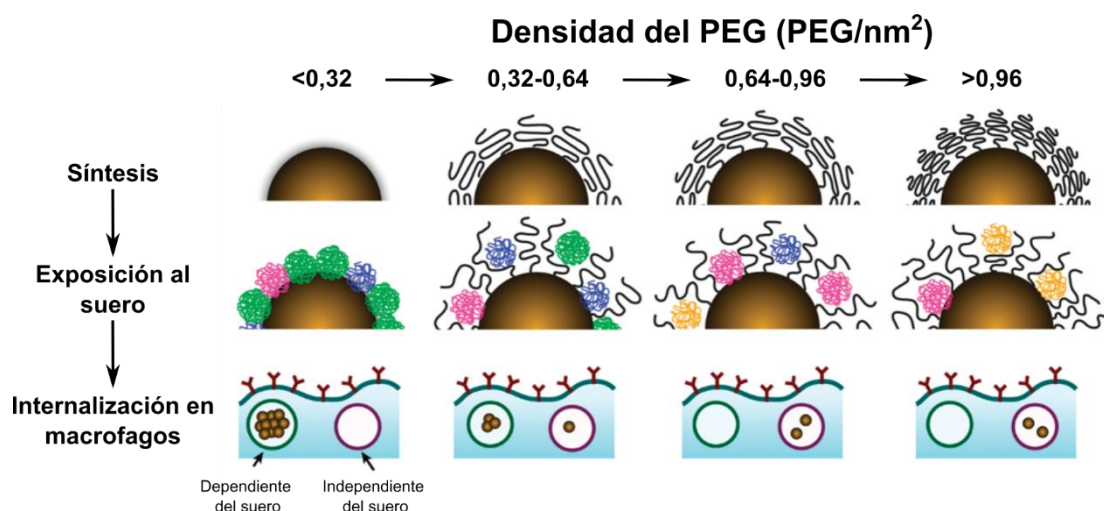


Figura 9. Efecto de la densidad del recubrimiento del polietilenglicol en la interacción con proteínas y la posterior internalización de las nanopartículas en macrófagos. Figura traducida de ref <sup>79</sup>.

Aunque los ejemplos anteriormente mencionados sirven como base para entender las interacciones de unión entre los ligandos y las nanopartículas, esta teoría queda limitada por las diferentes caras cristalográficas de un nanomaterial, así como las zonas de los vértices/aristas. Se necesita hacer un mayor esfuerzo en métodos computacionales que consideren la unión de un determinado ligando debido

## Capítulo 1

a su carácter blando/duro y su accesibilidad estérica para cada cara cristalografica.<sup>80</sup>

### 1.3.3 Biofuncionalización de las nanopartículas de oro

Una vez la nanopartícula está adecuadamente estabilizada, el siguiente paso es la estrategia de biofuncionalización o conjugación. Sin embargo, esto no es una tarea sencilla ya que no existen metodologías universales y dependen de los grupos funcionales de la superficie y la biomolécula a conjugar. Las metodologías de funcionalización de superficies se pueden dividir en tres categorías: la conjugación supramolecular, la adsorción física y la conjugación covalente (Figura 10).<sup>63,81</sup>

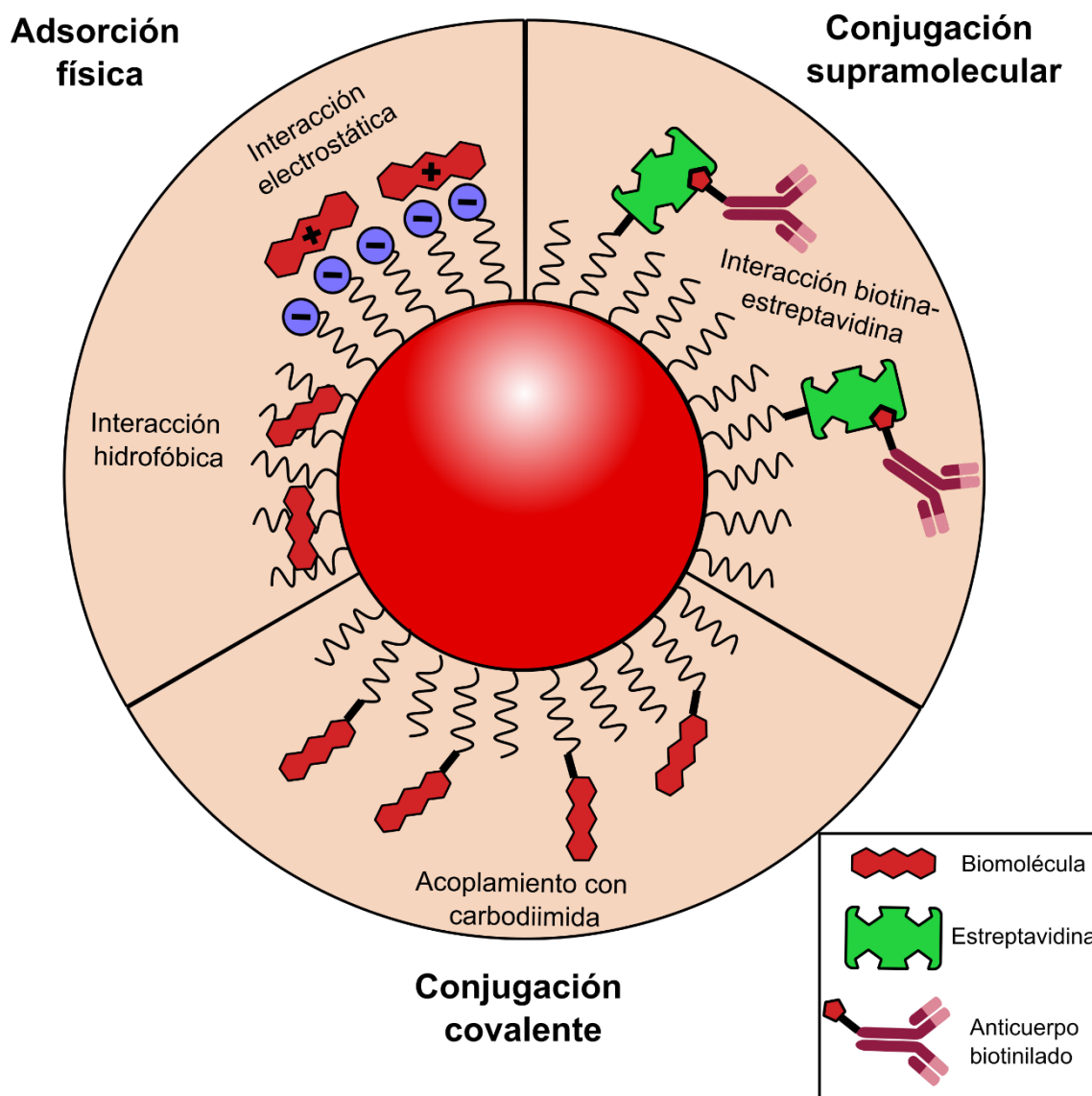


Figura 10. Estrategias de bioconjugación.<sup>82</sup>

La adsorción física de moléculas sobre el nanomaterial puede ocurrir mediante diversas interacciones que incluyen las fuerzas de Van der Waals, la formación de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, que dependerán de las características de la biomolécula y el recubrimiento de la NP.<sup>82,83</sup> La bioconjugación a través de interacciones físicas es altamente versátil, ya que ofrece la posibilidad de separar la biomolécula de la NP por cambios en las condiciones del medio. Sin embargo, esta estrategia no controla la orientación espacial de las biomoléculas inmovilizadas, lo que puede llevar a una disminución o pérdida

## Capítulo 1

de la actividad biológica. Debido a la reversibilidad de las interacciones físicas, mediante variaciones en pH, temperatura, o polaridad del medio se puede promover la desorción del componente inmovilizado.

La conjugación supramolecular se basa en el reconocimiento molecular entre un ligando y un receptor, en tanto que el ligando y el receptor se ajustan en un proceso dinámico de complementariedad química sin la formación de enlaces covalentes. El receptor suele unirse en la superficie de la nanopartícula mediante la formación de un enlace covalente, y la inmovilización del ligando ocurre a través del autoensamblaje anfitrión-huésped. El ejemplo más representativo de estas interacciones es el par biotina-avidina. La avidina es una glicoproteína que tiene cuatro subunidades idénticas y una alta selectividad y afinidad a la biotina, resultando en una fuerte interacción ( $K_{\text{aff}} \sim 10^{15}$ ).<sup>84</sup> El análogo más utilizado de avidina para la bioconjugación es la estreptavidina, que es un tetrámero no glicosilado. En la bibliografía encontramos muchos ejemplos de este tipo de funcionalización para aplicaciones de biosensores donde la nanopartícula se funcionaliza con estreptavidina y para su conjugación con biomoléculas biotiniladas tales como proteínas, oligonucleótidos, anticuerpos, o cadenas de ADN.<sup>85,86</sup>

El último tipo de conjugación que trataremos es la conjugación covalente o conjugación química, que proporciona una unión estable entre los grupos funcionales de la nanopartícula y la molécula o biomolécula, a diferencia de las interacciones físicas o supramoleculares que muestran una pérdida de la actividad a lo largo del tiempo.<sup>87,88</sup> La selección del método de acoplamiento dependerá de los grupos reactivos presentes en la superficie del material. Las superficies de las nanopartículas de esta tesis, por lo general, presentan siempre un grupo carboxilo, y se les aplica el acoplamiento con carbodiimida. El método de carbodiimida es uno de los

protocolos de funcionalización de nanopartículas más utilizados. Está basado en el acoplamiento peptídico entre un grupo carboxilo y una amina primaria. Durante la reacción química el grupo carboxilo es activado por un agente de acoplamiento como por ejemplo 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), formando un éster activo. Frecuentemente se añaden aditivos como la *N*-hidroxisuccidimida (NHS) o la sulfo-NHS para incrementar el rendimiento de reacción reduciendo posibles reacciones secundarias.<sup>89</sup> Además, este método tiene la ventaja que es formar un *zero-length cross linker* por no generar átomos adicionales en el enlace. Esta metodología requiere procesos de optimización para aumentar el rendimiento de reacción y evitar las posibles reacciones secundarias, que se tratarán en el Capítulo 2.

# **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en el diseño y la utilización de nanopartículas de oro para aplicaciones en diagnóstico y terapia. Para alcanzar este objetivo se dispone de dos elementos fundamentales. En primer lugar, se puede disponer de nanopartículas de oro de diversos tamaños y formas, características que tienen un impacto en sus propiedades ópticas y en su interacción con biomoléculas y células. En segundo lugar, la modificación superficial de la nanopartículas con biomoléculas permite adaptarlas a la aplicación concreta.

Se establecen los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de un amplificador de señal para pruebas diagnósticas basadas en la detección de ARN con un sensor de resonancia de plasmón de superficie.
- Utilización de nanopartículas de oro como transportadores de un fármaco hidrófobo.
- Desarrollo de un método escalable y eficaz para la purificación de nanoprismas de oro con el fin de aumentar su potencial en aplicaciones biomédicas.
- Utilización de nanoprismas de oro en terapia fototérmica dirigida.

En cada capítulo de esta tesis se introduce la importancia de uno de los objetivos y se explica la estrategia que se ha adoptado para abordarlo.



### **3.REFERENCIAS**

- (1) Boles, M. A.; Ling, D.; Hyeon, T.; Talapin, D. V. The Surface Science of Nanocrystals. *Nat. Mater.* **2016**, *15* (2), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nmat4526>.
- (2) Panwar, N.; Soehartono, A. M.; Chan, K. K.; Zeng, S.; Xu, G.; Qu, J.; Coquet, P.; Yong, K. T.; Chen, X. Nanocarbons for Biology and Medicine: Sensing, Imaging, and Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (16), 9559–9656. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00099>.
- (3) Saleh, T. A. Nanomaterials: Classification, Properties, and Environmental Toxicities. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, *20*, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>.
- (4) Abd Elkodous, M.; El-Sayyad, G. S.; Abdelrahman, I. Y.; El-Bastawisy, H. S.; Mohamed, A. E.; Mosallam, F. M.; Nasser, H. A.; Gobara, M.; Baraka, A.; Elsayed, M. A.; El-Batal, A. I. Therapeutic and Diagnostic Potential of Nanomaterials for Enhanced Biomedical Applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *180* (May), 411–428. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.008>.
- (5) Sanvicens, N.; Marco, M. P. Multifunctional Nanoparticles - Properties and Prospects for Their Use in Human Medicine. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (8), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
- (6) Li, M.; Du, C.; Guo, N.; Teng, Y.; Meng, X.; Sun, H.; Li, S.; Yu, P.; Galons, H. Composition Design and Medical Application of Liposomes. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 640–653. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>.
- (7) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.
- (8) Polizu, S.; Savadogo, O.; Poulin, P.; Yahia, L. Applications of Carbon Nanotubes-Based Biomaterials in Biomedical Nanotechnology. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (7), 1883–1904. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.197>.
- (9) Reshma, V. G.; Mohanan, P. V. Quantum Dots: Applications and Safety Consequences. *J. Lumin.* **2019**, *205* (September 2018), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.09.015>.
- (10) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101–124.

## Capítulo 1

<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

- (11) Chang, C.-C.; Chen, C.-P.; Wu, T.-H.; Yang, C.-H.; Lin, C.-W.; Chen, C.-Y. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Strategies for Chemical and Biological Sensing Applications. *Nanomaterials* **2019**, 9 (6), 861. <https://doi.org/10.3390/nano9060861>.
- (12) Krishnendu, S.; Sarit S., A.; Chaekyu, K.; Xiaoning, L.; Vincent M., R. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2014**, 112 (5), 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178.Gold>.
- (13) Lou, T.; Wang, Y.; Li, J.; Peng, H.; Xiong, H.; Chen, L. Rapid Detection of Melamine with 4-Mercaptopyridine-Modified Gold Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401 (1), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5067-3>.
- (14) Porter, M. D.; Lipert, R. J.; Siperko, L. M.; Wang, G.; Narayanan, R. SERS as a Bioassay Platform: Fundamentals, Design, and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (5), 1001–1011. <https://doi.org/10.1039/b708461g>.
- (15) Samanta, A.; Maiti, K. K.; Soh, K. S.; Liao, X.; Vendrell, M.; Dinish, U. S.; Yun, S. W.; Bhuvaneswari, R.; Kim, H.; Rautela, S.; Chung, J.; Olivo, M.; Chang, Y. T. Ultrasensitive Near-Infrared Raman Reporters for SERS-Based in Vivo Cancer Detection. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50 (27), 6089–6092. <https://doi.org/10.1002/anie.201007841>.
- (16) Zavaleta, C. L.; Smith, B. R.; Walton, I.; Doering, W.; Davis, G.; Shojaei, B.; Natan, M. J.; Gambhir, S. S. Multiplexed Imaging of Surface Enhanced Raman Scattering Nanotags in Living Mice Using Noninvasive Raman Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106 (32), 13511–13516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813327106>.
- (17) Van De Broek, B.; Devoogdt, N.; Dhollander, A.; Gijs, H. L.; Jans, K.; Lagae, L.; Muyldermans, S.; Maes, G.; Borghs, G. Specific Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy. *ACS Nano* **2011**, 5 (6), 4319–4328. <https://doi.org/10.1021/nn1023363>.
- (18) Moros, M.; Lewinska, A.; Merola, F.; Ferraro, P.; Wnuk, M.; Tino, A.; Tortiglione, C. Gold Nanorods and Nanoprisms Mediate Different Photothermal Cell Death Mechanisms in Vitro and in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (12), 13718–13730. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c02022>.

- (19) Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Gold Nanoprism–Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation Capacity. *Nanomedicine* **2016**, *11* (22), 2903–2916. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0257>.
- (20) Cartwright, M. Gold in Antiquity <https://www.worldhistory.org/gold/>.
- (21) Slepíčka, P.; Kasálková, N. S.; Siegel, J.; Kolská, Z.; Švorčík, V. Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. *Materials (Basel)*. **2020**, *13* (1), 1. <https://doi.org/10.3390/ma13010001>.
- (22) Barber, D. J.; Freestone, I. C. An Investigation of the Origin of the Colour of the Lycurgus Cup By Analytical Transmission Electron Microscopy. *Archaeometry* **1990**, *32* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x>.
- (23) Kumar, N.; Kumar, R. *Nanotechnology and Nanomaterials in the Treatment of Life-Threatening Diseases*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13374-0>.
- (24) Faraday, M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil. Trans. R. Soc.* **1857**, *147* (0), 145–181.
- (25) Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V. Gold Nanorod-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *195*, 332–351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.056>.
- (26) Yeh, Y. C.; Creran, B.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4* (6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.
- (27) Lacroce, E.; Saccomandi, P.; Rossi, F. Can Gold Nanoparticles Improve Delivery Performance of Polymeric Drug-Delivery Systems? *Ther. Deliv.* **2021**, *12* (7), 489–492. <https://doi.org/10.4155/tde-2021-0037>.
- (28) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-Enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems. *Plasmonics* **2007**, *2* (3), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s11468-007-9031-1>.
- (29) Polo, E.; Del Pino, P.; Pelaz, B.; Grazu, V.; De la Fuente, J. M. Plasmonic-Driven Thermal Sensing: Ultralow Detection of Cancer Markers. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (35), 3676–3678.

<https://doi.org/10.1039/c3cc39112d>.

- (30) Artiga, Á.; García-Embido, S.; De Matteis, L.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Effective in Vitro Photokilling by Cell-Adhesive Gold Nanorods. *Front. Chem.* **2018**, *6* (JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00234>.
- (31) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (9), 1746–1755. <https://doi.org/10.1039/c0nr00104j>.
- (32) Kang, B.; Mackey, M. A.; El-Sayed, M. A. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (5), 1517–1519. <https://doi.org/10.1021/ja9102698>.
- (33) Ali, M. R. K. K.; Wu, Y.; Tang, Y.; Xiao, H.; Chen, K.; Han, T.; Fang, N.; Wu, R.; El-Sayed, M. A. Targeting Cancer Cell Integrins Using Gold Nanorods in Photothermal Therapy Inhibits Migration through Affecting Cytoskeletal Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (28), E5655–E5663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703151114>.
- (34) Birtcher, R. C.; Donnelly, S. E.; Schlutig, S. Nanoparticle Ejection from Gold during Ion Irradiation. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2004**, *215* (1–2), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(03\)01789-0](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(03)01789-0).
- (35) Lung, J. K.; Huang, J. C.; Tien, D. C.; Liao, C. Y.; Tseng, K. H.; Tsung, T. T.; Kao, W. S.; Tsai, T. H.; Jwo, C. S.; Lin, H. M.; Stobinski, L. Preparation of Gold Nanoparticles by Arc Discharge in Water. *J. Alloys Compd.* **2007**, *434–435* (SPEC. ISS.), 655–658. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2006.08.213>.
- (36) Nguyen, D. T.; Kim, D. J.; Kim, K. S. Controlled Synthesis and Biomolecular Probe Application of Gold Nanoparticles. *Micron* **2011**, *42* (3), 207–227. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.008>.
- (37) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75.
- (38) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241* (105), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>.
- (39) Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (3–4), 638–665.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>.

- (40) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seeding Growth for Size Control of 5-40 Nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2001**, *17* (22), 6782–6786. <https://doi.org/10.1021/la0104323>.
- (41) Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (4), 1800–1804. <https://doi.org/10.1021/jp9091305>.
- (42) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801–802.
- (43) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (18), 1389–1393. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200109\)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F).
- (44) Wang, Z. L.; Mohamed, M. B.; Link, S.; El-Sayed, M. A. Crystallographic Facets and Shapes of Gold Nanorods of Different Aspect Ratios. *Surf. Sci.* **1999**, *440* (1–2). [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(99\)00865-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(99)00865-1).
- (45) Liu, M.; Guyot-Sionnest, P. Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (47), 22192–22200. <https://doi.org/10.1021/jp054808n>.
- (46) Ni, Y.; Kan, C.; Xu, J.; Liu, Y. The Synthesis of High Yield Au Nanoplate and Optimized Optical Properties. *Superlattices Microstruct.* **2018**, *114*, 124–142. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2017.12.021>.
- (47) Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M. Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 5833–5842. <https://doi.org/10.1021/nn500727w>.
- (48) Dovgolevsky, E.; Haick, H. Direct Observation of the Transition Point between Quasi-Spherical and Cubic Nanoparticles in a Two-Step Seed-Mediated Growth Method. *Small* **2008**, *4* (11), 2059–2066. <https://doi.org/10.1002/sml.200800207>.
- (49) Li, N.; Zhao, P.; Astruc, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**,

## Capítulo 1

- 53 (7), 1756–1789. <https://doi.org/10.1002/anie.201300441>.
- (50) Ha, T. H.; Koo, H. J.; Chung, B. H. Shape-Controlled Syntheses of Gold Nanoprisms and Nanorods Influenced by Specific Adsorption of Halide Ions. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/jp066454l>.
- (51) Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. A. Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9518–9524. <https://doi.org/10.1021/la900757s>.
- (52) Alkilany, A. M.; Nalaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708. <https://doi.org/10.1002/sml.200801546>.
- (53) Geng, X.; Roth, K. L.; Freyman, M. C.; Liu, J.; Grove, T. Z. Seed-Mediated Biomineralization toward the High Yield Production of Gold Nanoprisms. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (63), 9829–9832. <https://doi.org/10.1039/c6cc04708d>.
- (54) Ah, C. S.; Yun, Y. J.; Park, H. J.; Kim, W. J.; Ha, D. H.; Yun, W. S. Size-Controlled Synthesis of Machinable Single Crystalline Gold Nanoplates. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (22), 5558–5561. <https://doi.org/10.1021/cm051225h>.
- (55) Xiong, Y.; Washio, I.; Chen, J.; Cai, H.; Li, Z. Y.; Xia, Y. Poly (Vinyl Pyrrolidone): A Dual Functional Reductant and Stabilizer for the Facile Synthesis of Noble Metal Nanoplates in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2006**, *22* (20), 8563–8570. <https://doi.org/10.1021/la061323x>.
- (56) Lee, J. H.; Kamada, K.; Enomoto, N.; Hojo, J. Polyhedral Gold Nanoplate: High Fraction Synthesis of Two-Dimensional Nanoparticles through Rapid Heating Process. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (8), 2638–2645. <https://doi.org/10.1021/cg0702075>.
- (57) Viarbitskaya, S.; Teulle, A.; Marty, R.; Sharma, J.; Girard, C.; Arbouet, A.; Dujardin, E. Tailoring and Imaging the Plasmonic Local Density of States in Crystalline Nanoprisms. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (5), 426–432. <https://doi.org/10.1038/nmat3581>.
- (58) Liebig, F.; Sarhan, R. M.; Prietzel, C.; Reinecke, A.; Koetz, J. “Green” Gold Nanotriangles: Synthesis, Purification by Polyelectrolyte/Micelle Depletion Flocculation and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *RSC Adv.* **2016**, *6* (40), 33561–33568. <https://doi.org/10.1039/c6ra04808k>.

- (59) Balasubramanian, S.; Bezawada, S. R.; Raghavachari, D. Green, Selective, Seedless and One-Pot Synthesis of Triangular Au Nanoplates of Controlled Size Using Bael Gum and Mechanistic Study. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4 (7), 3830–3839. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00596>.
- (60) Sun, Z.; Chen, X.; Wang, L.; Zhang, G.; Jing, B. Synthesis of Gold Nanoplates in Lamellar Liquid Crystal. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 326 (1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.05.006>.
- (61) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, 28 (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (62) Saverot, S.-E. E.; Reese, L. M.; Cimini, D.; Vikesland, P. J.; Bickford, L. R. Characterization of Conventional One-Step Sodium Thiosulfate Facilitated Gold Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, 10 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0940-1>.
- (63) Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *J. Clust. Sci.* **2021**, 9. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>.
- (64) Wang, W.; Mattoussi, H. Engineering the Bio–Nano Interface Using a Multifunctional Coordinating Polymer Coating. *Acc. Chem. Res.* **2020**, 53 (6), 1124–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00641>.
- (65) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 Nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir* **1998**, 14 (1), 17–30. <https://doi.org/10.1021/la970588w>.
- (66) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (5), 1805–1834. <https://doi.org/10.1039/b907301a>.
- (67) Colangelo, E.; Comenge, J.; Paramelle, D.; Volk, M.; Chen, Q.; Lévy, R. Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (1), 11–22. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00587>.
- (68) Woodruff, D. P. The Interface Structure of N-Alkylthiolate Self-

## Capítulo 1

- Assembled Monolayers on Coinage Metal Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (48), 7211. <https://doi.org/10.1039/b813948b>.
- (69) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.
- (70) Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; DuBois, L. H. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Au(111). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (3), 733–740. <https://doi.org/10.1021/ja00237a017>.
- (71) Scher, E. C.; Manna, L.; Alivisatos, A. P. Shape Control and Applications of Nanocrystals. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2003**, *361* (1803), 241–257. <https://doi.org/10.1098/rsta.2002.1126>.
- (72) Harris, J. M.; Chess, R. B. Effect of Pegylation on Pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (3), 214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>.
- (73) Lee, H.; De Vries, A. H.; Marrink, S. J.; Pastor, R. W. A Coarse-Grained Model for Polyethylene Oxide and Polyethylene Glycol: Conformation and Hydrodynamics. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (40), 13186–13194. <https://doi.org/10.1021/jp9058966>.
- (74) de Gennes, P. G. Conformations of Polymers Attached to an Interface. *Macromolecules* **1980**, *13* (5), 1069–1075. <https://doi.org/10.1021/ma60077a009>.
- (75) Allara, D. L.; Nuzzo, R. G. Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 1. Formation, Dynamics, and Physical Properties of n-Alkanoic Acids Adsorbed from Solution on an Oxidized Aluminum Surface. *Langmuir* **1985**, *1* (1), 45–52. <https://doi.org/10.1021/la00061a007>.
- (76) Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43* (1), 437–463. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.43.100192.002253>.
- (77) Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Modular Poly(Ethylene Glycol) Ligands for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals with Extended PH and Ionic Stability. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (41), 4949–4958. <https://doi.org/10.1039/b810488c>.



- (78) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>.
- (79) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. Understanding and Controlling the Interaction of Nanomaterials with Proteins in a Physiological Environment. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780–2799. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>.
- (80) Häkkinen, H. The Gold-Sulfur Interface at the Nanoscale. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (6), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nchem.1352>.
- (81) Marques, A. C. C.; Costa, P. J. J.; Velho, S.; Amaral, M. H. H. Functionalizing Nanoparticles with Cancer-Targeting Antibodies: A Comparison of Strategies. *J. Control. Release* **2020**, *320* (December 2019), 180–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.035>.
- (82) Iriarte-Mesa, C.; López, Y. C.; Matos-Peralta, Y.; de la Vega-Hernández, K.; Antuch, M. Gold, Silver and Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Bionanoconjugation Strategies Aimed at Electrochemical Applications. *Top. Curr. Chem.* **2020**, *378* (1), 12. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0275-y>.
- (83) Thiruppathi, R.; Mishra, S.; Ganapathy, M.; Padmanabhan, P.; Gulyás, B. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Adv. Sci.* **2017**, *4* (3). <https://doi.org/10.1002/advs.201600279>.
- (84) Dreesen, L.; Sartenar, Y.; Humbert, C.; Mani, A. A.; Méthivier, C.; Pradier, C. M.; Thiry, P. A.; Peremans, A. Probing Ligand-Protein Recognition with Sum-Frequency Generation Spectroscopy: The Avidin-Biotin Case. *ChemPhysChem* **2004**, *5* (11), 1719–1725. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400213>.
- (85) Afsharan, H.; Khalilzadeh, B.; Tajalli, H.; Mollabashi, M.; Navaeipour, F.; Rashidi, M. R. A Sandwich Type Immunosensor for Ultrasensitive Electrochemical Quantification of P53 Protein Based on Gold Nanoparticles/Graphene Oxide. *Electrochim. Acta* **2016**, *188*, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.133>.
- (86) Ly, T. N.; Park, S.; Park, S. J. Detection of HIV-1 Antigen by Quartz Crystal Microbalance Using Gold Nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *237*, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.112>.
- (87) Hirsh, S. L.; Bilek, M. M. M.; Nosworthy, N. J.; Kondyurin, A.; Dos Remedios, C. G.; McKenzie, D. R. A Comparison of Covalent Immobilization and Physical Adsorption of a Cellulase Enzyme

## Capítulo 1

- Mixture. *Langmuir* **2010**, 26 (17), 14380–14388.  
<https://doi.org/10.1021/la1019845>.
- (88) Ou, X.; Jiang, L.; Chen, P.; Zhu, M.; Hu, W.; Liu, M.; Zhu, J.; Ju, H. Highly Stable Graphene-Based Multilayer Films Immobilized via Covalent Bonds and Their Applications in Organic Field-Effect Transistors. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23 (19), 2422–2435.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.201202586>.
- (89) Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. *Anal. Biochem.* **1986**, 156 (1), 220–222.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90176-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90176-4).

# **Capítulo 2**

## **Síntesis y aplicación de nanopartículas de oro en biosensores**

## Capítulo 2

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los biosensores son dispositivos capaces de ofrecer una información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa usando un elemento biológico. Para competir con otras tecnologías es deseable que los biosensores proporcionen información de forma rápida, en tiempo real, precisa y fiable sobre el analito a analizar. Los biosensores juegan un papel importante en medicina, agricultura, medio ambiente y monitorización industrial. Se dividen en tres componentes principales: un biorreceptor, un transductor y un sistema de procesamiento de señal.

El biorreceptor es un material biológico que reconoce el analito e interacciona con él. Este receptor debe ser selectivo y sensible frente al analito para evitar las interferencias por otras sustancias de la muestra. Según el tipo de interacción que se establece entre el analito y el receptor los biosensores pueden ser catalíticos o de afinidad.<sup>1</sup> En los biosensores catalíticos, entre los que se incluyen los basados en enzimas<sup>2</sup> y los basados en sistema celulares,<sup>3</sup> la interacción entre el analito y el biorreceptor da lugar a un producto de una reacción bioquímica. En el caso de los biosensores de afinidad, el analito se une al receptor por interacciones no covalentes y de alta afinidad. En este tipo de sensores están comprendidos los que utilizan anticuerpos<sup>4</sup> o ácidos nucleicos<sup>5</sup> como biorreceptores.

Los biosensores también se pueden clasificar según el tipo de transductor empleado, que es el elemento que convierte la interacción en un efecto físico, químico o biológico, que finalmente pueda ser transformado en una señal.<sup>6</sup> Dentro de esta clasificación encontramos biosensores electroquímicos,<sup>7</sup> térmicos,<sup>8</sup> ópticos,<sup>9</sup> y gravimétricos.<sup>10</sup>

Los biosensores ópticos son los más ampliamente utilizados si se tiene en cuenta el tipo de transducción.<sup>11</sup> Dentro de estos sensores uno de los más

## Capítulo 2

importantes es la técnica de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR), que presenta una alta sensibilidad, amplio rango de aplicación y seguimiento en tiempo real.<sup>12</sup> El SPR es además un sensor de detección directa, es decir, que no requiere del empleo de marcadores como sucede con otros biosensores ópticos. El SPR detecta cambios en la resonancia del plasmón de superficie de una lámina de oro que se producen por el cambio en el índice de refracción del medio adyacente cuando se deposita materia en la proximidad de la lámina (Figura 1). Una etapa importante para que el biosensor llegue a funcionar, es la funcionalización de la superficie con un biorreceptor capaz de reconocer el analito de interés y se deben evitar interacciones no específicas de otras sustancias con el biorreceptor o con la superficie.

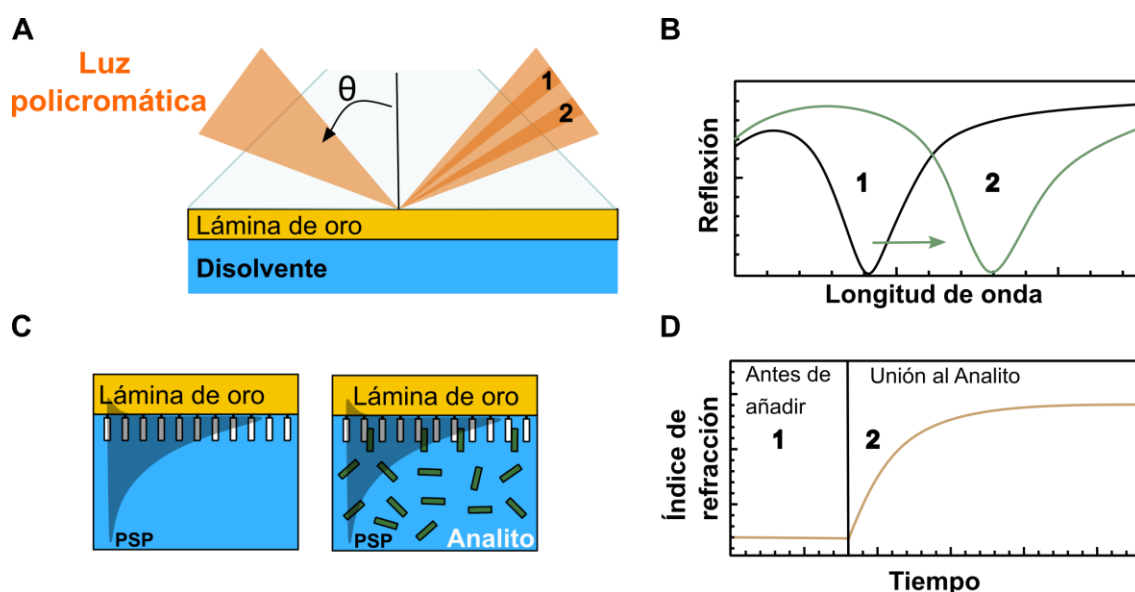


Figura 1. Esquema de un biosensor de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR).<sup>13</sup>

Este capítulo de tesis es parte del trabajo realizado en el marco del proyecto europeo, NanoplasmiRNA, que planteaba el desarrollo de un reactivo universal de amplificación de señal para la detección de microARN (miARN) por imagen SPR (SPRi), técnica SPR que permite el análisis

simultáneo de varios analitos. Para la detección de este tipo de biomarcadores el chip del SPR se funcionaliza con una sonda de captura que consiste en un oligonucleótido de ADN complementario del miARN que se quiere analizar. Los miARN son cadenas de ARN no codificante que circulan en la sangre y están involucrados en múltiples procesos biológicos como metabolismo, proliferación, desarrollo, diferenciación, apoptosis, resistencia a fármacos y respuesta al estrés.<sup>14</sup> Existen muchas evidencias de que los niveles de miARN específicos están relacionados con trastornos humanos incluidos el cáncer,<sup>15</sup> enfermedades neurológicas<sup>16</sup> y enfermedades cardiovasculares,<sup>17</sup> por lo que podrían utilizarse para estudiar el progreso de esas enfermedades. Sin embargo, su pequeño tamaño, baja concentración y la abundancia de secuencias similares de miARNs pueden dificultar la detección y cuantificación por metodologías actuales como PCR, secuenciación masiva, microarrays o el mismo SPR,<sup>18</sup> además, de limitar el número de muestras que se pueden procesar.

En la bibliografía se han descrito métodos para aumentar la señal en SPR y así mejorar el límite de detección (LOD).<sup>19–21</sup> Estos métodos consisten en la adición de un segundo biorreceptor o amplificador de señal, capaz de reconocer específicamente el complejo formado por el analito y el primer biorreceptor. Este segundo biorreceptor puede estar conjugado con un elemento que produzca un gran aumento de señal, por ejemplo, por ser muy masivo como nanopartículas de oro.

En NanoplasmiRNA se planteó el diseño y síntesis de un amplificador universal de señal SPR para la detección de cualquier miARN. Para el proyecto era necesario que estos nanoamplificadores se unieran selectivamente a la doble hebra ADN:ARN, que se forma por la interacción específica de la sonda de ADN con el analito y que no interaccionaran cuando hubiera una única cadena de ácido nucleico. Para producir esta

## Capítulo 2

interacción de la nanopartícula con el híbrido se eligieron intercalantes de ADN capaces de unirse con la doble hebra por interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . Se seleccionaron dos estructuras de intercalantes (Figura 2): la doxorrubicina, que es el fármaco anticancerígeno más efectivo de los últimos 50 años para enfermedades como la leucemia, linfoma o cáncer de mama<sup>22</sup> y otro derivado de la antraquinona, cuya estructura se modifica para mejorar la interacción con la estructura de ADN. Para conseguir una mayor amplificación de la señal se eligieron las nanopartículas de oro, que ya han demostrado ser buenos amplificadores, en algunos casos de varios órdenes de magnitud, debido al cambio en la masa y a la variación en el índice de refracción local de la superficie de SPR.<sup>23</sup> Sin embargo, aún falta una comprensión más profunda de la relación entre la amplificación de la señal y la forma y el tamaño de las AuNPs.

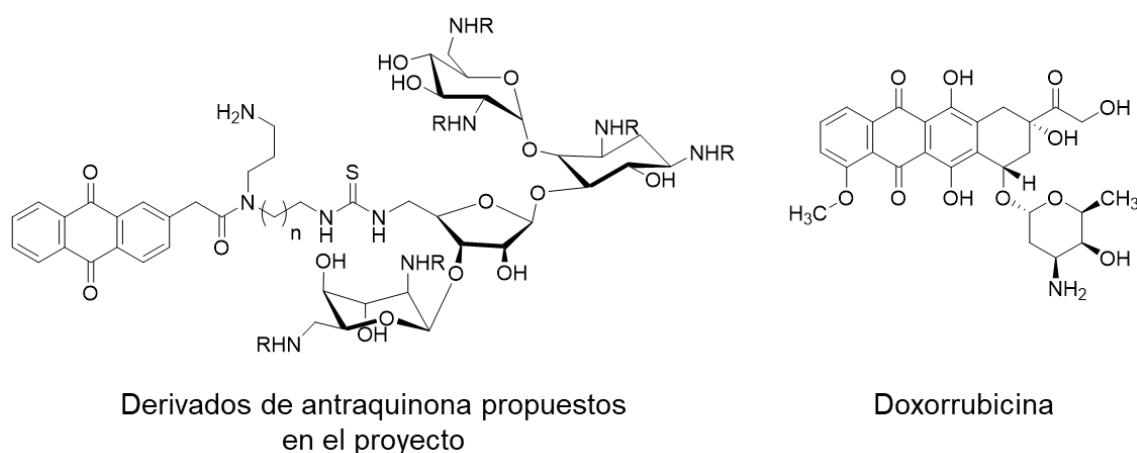


Figura 2. Estructuras de los intercalantes de ADN derivados de antraquinona utilizados en el proyecto. Nota: R es un grupo protector

En la superficie del chip de SPR, se une el ADN de captura complementario a la secuencia de miRNA objetivo (Figura 3). Para que el amplificador de señal sea universal, el intercalante de ADN no puede ser específico de ninguna secuencia concreta, pero también es importante que



únicamente se intercale cuando esté formado el híbrido ADN:ARN. Esto permitiría utilizar esta tecnología para la detección de miARNs relacionados con diferentes enfermedades.

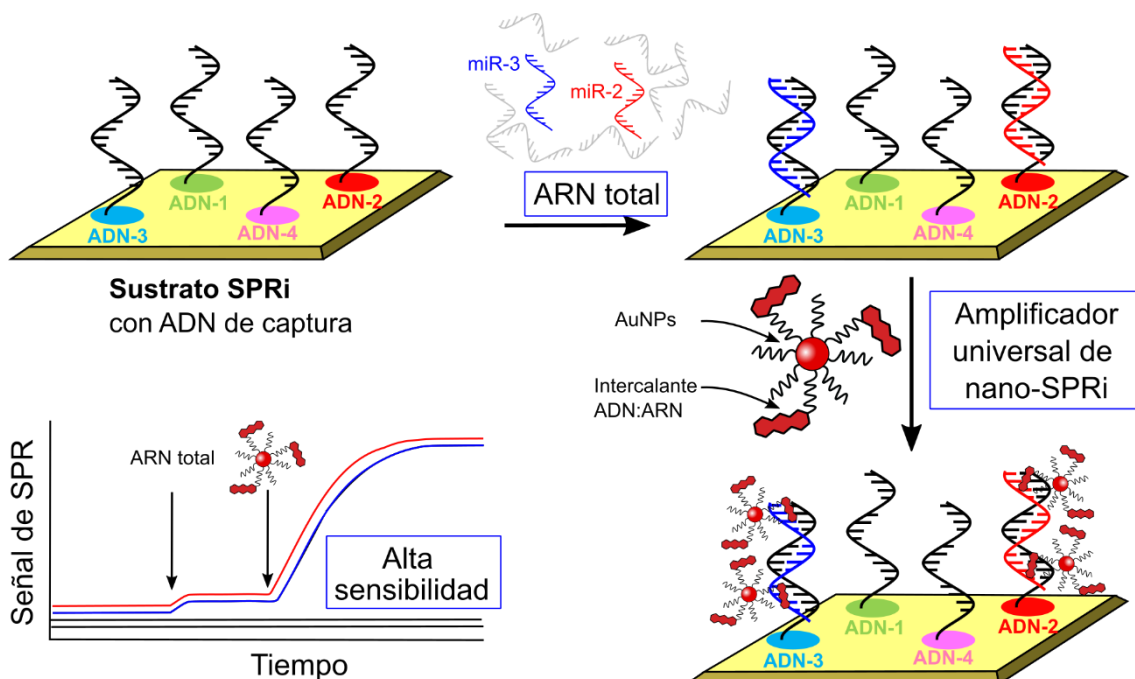


Figura 3. Esquema de la estrategia para la amplificación de la señal de SPRi con intercalantes de ADN. En un primer paso, se añaden las secuencias de microARN para que se unan a las cadenas de ADN en el chip de SPR. Posteriormente, se adicionan las nanopartículas funcionalizadas con el intercalante de ADN:miARN para amplificar la señal de SPR.

La forma y el tamaño de las nanopartículas unidas al intercalante podrían afectar a dicha interacción, bien porque se restrinja la probabilidad de aproximación al híbrido ADN:ARN por impedimento estérico, bien porque, aun estando próximos, el grado de curvatura de la superficie no sea adecuado para la interacción. En trabajos del grupo de Lee<sup>20</sup> se determinó que las nanoesferas de 40 nm producían una mayor amplificación de la señal de SPR en comparación con nanocubos y nanobastones. En cuanto al tamaño, en un trabajo desarrollado por Uludag *et al.*<sup>19</sup> se modificó la

## Capítulo 2

superficie de oro con un anticuerpo contra el antígeno prostático específico (PSA). El aumento del diámetro de la nanopartícula de 20 a 40 nm redujo el límite de detección 10 veces. Dado que no se puede predecir el efecto de la forma y del tamaño en la amplificación, se seleccionaron dos formas (nanoesferas y nanoprismas) y dos tamaños para probar en el biosensor (Figura 4).

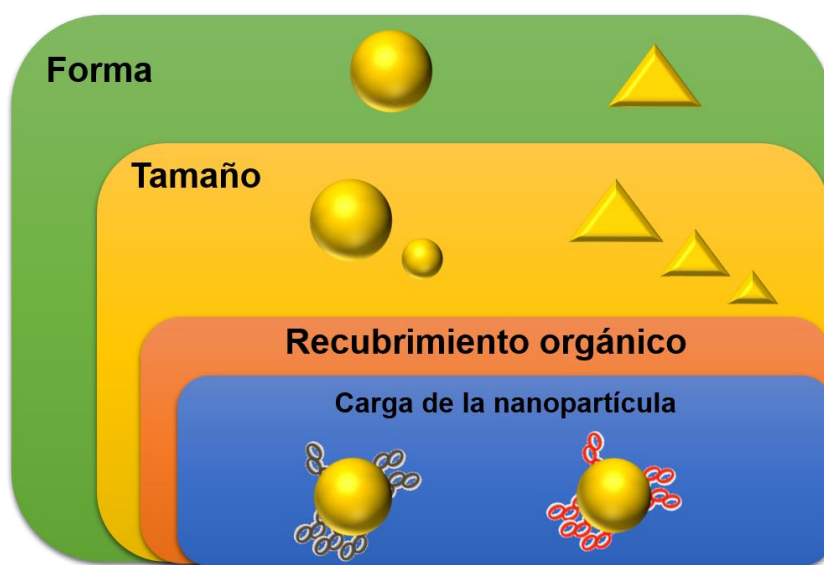


Figura 4. Nanopartículas seleccionadas para emplearlas como nanoamplificadores.

Para que el intercalante se una a la doble hebra se tiene que considerar la carga negativa del ácido nucleico, por lo que la carga de la nanopartícula, así como la cantidad de polímero recubriendo la superficie afectarán a dicha interacción. Por otro lado, la accesibilidad del intercalante dependerá de la conformación del polímero en el recubrimiento y esta a su vez de la densidad de moléculas unidas a la nanopartícula (Figura 4).

En NanoplasmiRNA se ha elegido la detección de la esclerosis múltiple para la prueba de concepto del amplificador de señal SPR. La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad crónica y autoinmune que

perturba el sistema nervioso central. Afecta predominantemente a adultos jóvenes y tiene un alto impacto en la calidad de vida del paciente. Se estima que 2-3 millones de personas viven con esclerosis múltiple en todo el mundo con una prevalencia de 50-300 afectados por 100.000 habitantes.<sup>24</sup> El curso de la MS es muy variado e impredecible. En la mayoría de los pacientes, la enfermedad se caracteriza por episodios reversibles de déficits neurológicos, a los que sigue un deterioro neurológico progresivo a largo plazo.<sup>25</sup> El seguimiento de esta enfermedad y el tratamiento se basan únicamente en criterios subjetivos y de bajo carácter predictivo, como la resonancia magnética de imagen, análisis de determinados marcadores bioquímicos y el estado clínico del paciente.<sup>26</sup> Es por ello que un diagnóstico temprano permitiría el mejor tratamiento de la enfermedad.

En este proyecto colaboran cuatro grupos de investigación. El grupo liderado por el Dr. Renzo Vanna en la Fondazione Don Carlo Gnocchi (Milán, Italia) es el encargado de la coordinación y la prueba de las nanopartículas preparadas para el incremento de la señal de SPR. Por otro lado, nuestro grupo, liderado por el Prof. Jesús M. de la Fuente en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (Zaragoza, España), tiene la labor de preparar las nanopartículas de oro y funcionalizarlas con los intercalantes de ADN. El grupo de la Prof. Aija Line en el Latvian Biomedical Research and Study Centre (Riga, Letonia), tiene la tarea de seleccionar las cadenas miARN a través de búsqueda bibliográfica y secuenciación validada por qPCR. Finalmente, el grupo del Prof. Dev Arya en Clemson University (Clemson, Estados Unidos de América) se encarga de la síntesis de los intercalantes de ADN derivados de la antraquinona.

Por todo lo expuesto anteriormente, se necesita la preparación de materiales de diferentes formas y tamaños, así como el control de la funcionalización de su superficie para la aplicación en el biosensor. Para ello,

## Capítulo 2

en este capítulo de tesis se describe la síntesis de nanoesferas (NSs) y nanoprismas (NPrs) de oro de dos tamaños diferentes (Figura 4). Las síntesis que se aplican se centran en la experiencia previa del grupo, evitando protocolos que requieran un pasaje a agua para poder usar las nanopartículas. Los materiales también requieren de una fase de estabilización que será más importante en la síntesis de los nanoprismas para parar la reacción de crecimiento. Posteriormente, las nanopartículas se funcionalizan con doxorubicina como intercalante de ADN puesto que no se llegó a disponer de ningún otro derivado de antraquinona. Finalmente, las nanopartículas preparadas se prueban como amplificadores universales de la señal de SPR, haciendo un estudio sobre el efecto de la superficie de la nanopartícula en la detección de cadenas de miRNA.

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.1 Síntesis de nanopartículas**

#### **2.1.1 Método de síntesis de las nanoesferas**

El método de Turkevich<sup>27</sup> para la síntesis de nanoesferas de oro consiste en la reducción del ácido tetracloroaúrico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con citrato sódico (Cit). Esta metodología permite un buen control del tamaño por debajo de 30 nm de diámetro. La síntesis se realiza en agua y evita pasos adicionales para transferir las nanopartículas desde medio orgánico a disolución acuosa. Los materiales se mantienen estables durante un largo tiempo y los ligandos citrato se pueden intercambiar fácilmente para conseguir la estabilización y funcionalización más adecuadas para la aplicación final.

La reacción se lleva a cabo en condiciones de reflujo y con agitación continua. Tras la adición del citrato, la disolución se oscurece indicando la formación de las nanopartículas y la mezcla se mantiene agitando a reflujo durante 30 min (Figura 5). Las nanoesferas recubiertas de citrato (NS-Cit) se obtienen con baja polidispersidad. Se evita añadir cualquier paso de purificación o concentración ya que podría afectar a la estabilidad de estos materiales. El citrato también actúa como agente estabilizante y es suficiente para que con la concentración de la síntesis las nanopartículas se mantengan estables a lo largo del tiempo si se guardan en nevera y tapadas de la luz.

## Capítulo 2

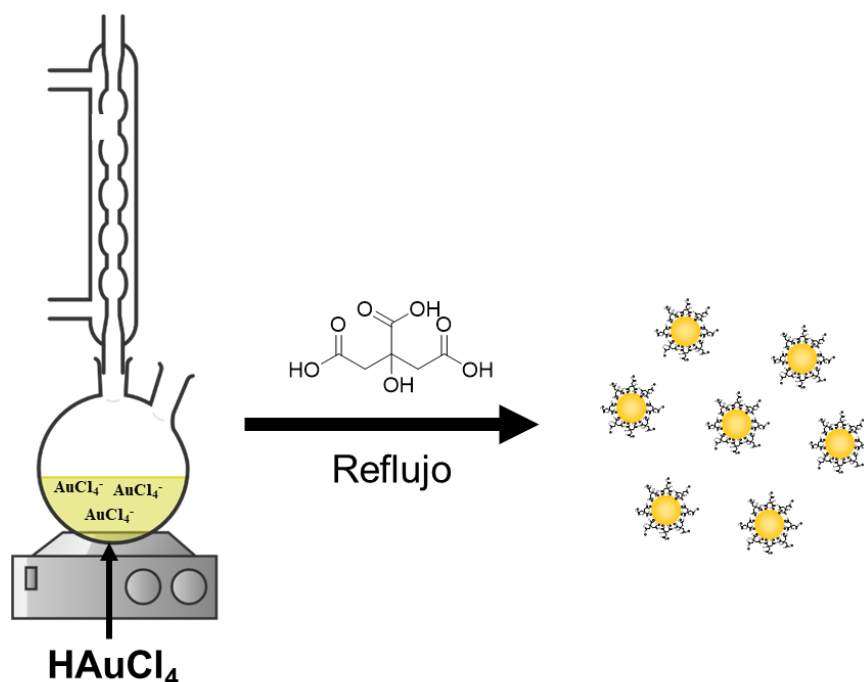


Figura 5. Esquema de la síntesis de nanoesferas de citrato (NS-Cit) siguiendo el método de Turkevich.

Para la caracterización inicial de las nanopartículas de oro se utiliza la espectroscopía de UV-Vis que permite conocer el estado coloidal y estimar el tamaño de las nanopartículas. El espectro de las nanopartículas presenta la banda de resonancia del plasmón localizado de superficie (LSPR) característica a 520 nm (Figura 6, A). De acuerdo con el trabajo de Haiss et al. el tamaño de nanoesferas de oro mayores de 37 nm de diámetro se puede obtener a partir de la posición de la banda de LSPR y el de nanoesferas menores de ese tamaño a partir del cociente entre la absorbancia en el máximo de la banda de LSPR y la absorbancia a 450 nm.<sup>28</sup> Siguiendo ese método se puede estimar un diámetro de 14 nm.

Por otro lado, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 6, B) y el histograma obtenido a partir de ellas (Figura 6, C) muestran que las nanoesferas son esencialmente monodispersas y

proporcionan un diámetro de  $14 \pm 1$  nm que es coherente con el resultado de la espectroscopía UV-Vis.

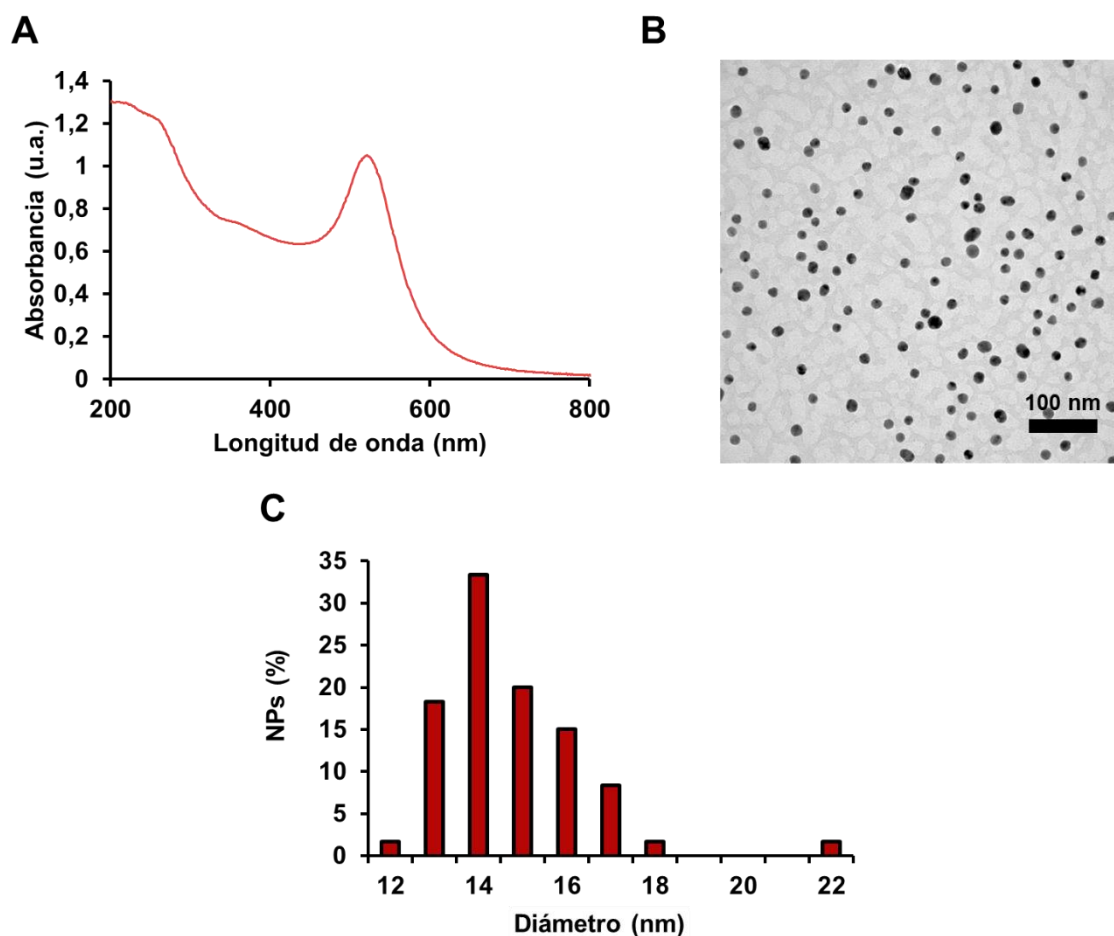


Figura 6. Caracterización de las nanoesferas de NS-Cit por espectroscopía de UV-Vis (A), imágenes de TEM (B) e histograma de tamaños (C).

Para conocer la concentración de las nanopartículas se determina la cantidad de oro por ICP-AES de una muestra de la que se conoce su espectro a una determinada dilución. En la bibliografía, se ha demostrado que la absorción a 400 nm es la más adecuada para una medida precisa de la concentración de Au(0).<sup>29,30</sup> Por debajo de 400 nm, la absorbancia debida a sustancias orgánicas podría interferir en la medida de la concentración de oro. Por encima de 400 nm aumenta la influencia del LSPR de las NPs. A 400 nm, se ha reportado un coeficiente de extinción de las nanopartículas

## Capítulo 2

que tiene un valor de  $11,3 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .<sup>29,30</sup> Dicho valor de coeficiente de extinción es similar al obtenido experimentalmente a partir de nuestros resultados de ICP-AES y espectroscopía UV-Vis:  $11,1 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

Por otro lado, con el diámetro de la partícula se determina la masa del núcleo metálico utilizando el volumen de una esfera y la densidad:<sup>31</sup>

$$M_{NP} = \frac{\pi \rho D^3 \cdot 10^{-21}}{6} \cdot N_{Av} = 6086 \cdot D^3 \text{ g mol}^{-1}$$

donde  $\rho$  es la densidad del oro fcc ( $19,3 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $D$  es el diámetro de la partícula en nm y  $N_{Av}$  es el número de Avogadro ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ).

De esta forma se puede estimar la masa del núcleo y determinar el coeficiente de extinción molar de las nanopartículas para determinar la cantidad de ligandos o moléculas que se unen por NP o unidad de superficie (Tabla 1). Para comparar el valor obtenido experimentalmente, nos basamos en el trabajo de Haiss *et al*<sup>28</sup> donde están tabulados los valores de los coeficientes de nanoesferas de diferentes tamaños a 450 nm.

Tabla 1. Diámetro de la nanoesferas con su correspondiente valor de coeficiente de extinción molar obtenido por ICP-AES y tabulado en literatura.<sup>28</sup>

Diámetro (nm) <sup>1</sup>	$\epsilon_{450}$ Experimental ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon_{450}$ tabulado ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
<b><math>14 \pm 1</math></b>	$1,58 \cdot 10^8$	$1,76 \cdot 10^8$

<sup>1</sup>Diámetro determinado por TEM.

Las NSs-Cit son estables en agua desionizada, pero pierden su estabilidad coloidal al aumentar la fuerza iónica, al cambiar el pH, o al añadir medios más complejos. Por lo tanto, se requiere de un posterior recubrimiento de la superficie para mejorar su estabilidad. Generalmente, para aplicaciones biomédicas las AuNPs se estabilizan mediante el uso de



polietilenglicol (PEG) ya que es un polímero considerado como seguro por la Agencia Federal del Medicamento (FDA) y que aumenta la hidrofiliidad de la superficie de las partículas, estabilizándolas. Los polímeros usados en esta tesis son polietilenglicoles heterobifuncionales que en un extremo tienen un grupo tiol para conseguir una unión fuerte a la superficie de oro. En el otro extremo presentan un grupo terminal, por lo general un grupo carboxilo, que confiere solubilidad y mayor estabilidad coloidal a las nanopartículas. Este grupo funcional aumenta la estabilidad coloidal de las nanopartículas mediante la repulsión entre cargas negativas y sirve también para una posterior modificación covalente utilizando reacciones propias de los grupos carboxilo.

Las cadenas de PEG, polares y neutras, sirven también para disminuir la interacción con biomoléculas y componentes biológicos que normalmente se adhieren a superficies cargadas o hidrófobas. La eficacia del PEG en esta función dependerá de factores interrelacionados como son el peso molecular del PEG, sus grupos terminales, la naturaleza y topología de la superficie que se recubre, la densidad del recubrimiento y la conformación que adquieren las moléculas de PEG en la superficie. Un estudio interesante sería la evaluación de cómo la superficie de las nanopartículas ya sea triangulares, rectangulares o esféricas, afectan a la conformación de diferentes cadenas PEG y cómo interaccionan entre ellas. Asimismo, se podría evaluar qué efecto tienen estas cadenas en la estabilidad coloidal y la aplicación de estas nanopartículas en diagnóstico y tratamiento.

En la Figura 7, se presentan los diferentes tipos de modificaciones que entran en este estudio. En primer lugar, se plantea usar mezclas de polímeros que presenten grupos carboxilos ( $-\text{COOH}$ ) y grupos metoxi ( $-\text{OCH}_3$ ) terminales para modular la carga de la nanopartícula. Si bien nuestro grupo ha trabajado casi siempre con grupos carboxilato terminales, la presencia de



a tener en cuenta. Las proteínas presentes en el suero tienen grupos tioles que podrían desplazar los PEG del recubrimiento por lo que la introducción de un grupo tiol adicional podría fortalecer la unión a la superficie (Figura 7, LA-PEG922).

Como polímero inicial se usa un PEG heterobifuncional, HS-PEG(8)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH (Figura 7, PEG458), que había dado buenos resultados en el grupo para estabilizar las nanopartículas esféricas.<sup>33</sup> La selección de las condiciones del intercambio de ligando entre las moléculas de citrato en la superficie y los grupos tioles del polímero se hace a partir de una modificación del protocolo descrito por Mirkin y colaboradores para la unión de cadenas de ADN tiolado a nanoesferas de 13 nm recubiertas con citrato.<sup>34</sup> En este protocolo, a las nanoesferas con citrato se les añade el compuesto tiolado, PEG458, junto a hidróxido de sodio y el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS). Se dejan incubando toda la noche protegidas de la luz. Al día siguiente se efectúan ciclos de lavado con agua milli-Q y centrifugación para purificar y concentrar las nanopartículas PEGiladas. Nuestro estudio concluyó que se obtienen los mejores resultados cuando se añaden 5200 cadenas PEG/NP o 8,44 PEG·nm<sup>-2</sup>.

Se repite el protocolo en las condiciones previamente optimizadas. El número de cadenas PEG que se unen a las nanopartículas se cuantifica midiendo la concentración de PEG tiolado presente en los sobrenadantes mediante el ensayo colorimétrico de Ellman. Este ensayo se basa en la reacción del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) con los grupos tioles del PEG, que produce una disolución amarilla por la formación de sales del ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico. Se concluyó que se unen 4,7 PEG nm<sup>-2</sup>.

Por otro lado, se modula la carga de la nanopartícula mediante la mezcla de cadenas de polietilenglicol cargadas y no cargadas. En trabajos

## Capítulo 2

previos del grupo, PEG458 se usó como molécula cargada con un grupo carboxilo junto con un PEG que presenta un grupo azida (HS-PEG-N<sub>3</sub>) en uno de sus extremos. Se decide cambiar el grupo azida por un grupo metoxi (HS-PEG-OMe de 356 Da) que no requiere síntesis previa del polímero y no genera problemas de estabilidad. Se fija la concentración optimizada para el PEG458 con 8,44 PEG·nm<sup>-2</sup> considerando el 100% de saturación. Se modifica la cantidad de cadenas metoxi totales, usando 0, 25, 50, 75 y 100 %, teniendo en cuenta un total de cadenas añadidas de 8,44 PEG/nm<sup>2</sup>.

Para el estudio de la estabilidad coloidal de los materiales se emplean la espectroscopía de UV-vis y la electroforesis en gel de agarosa. Como se ha visto previamente, la espectroscopía de UV-vis aporta información del tamaño y de la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Uno de los factores que influyen en la posición de la banda LSPR es el estado de agregación, desplazándose a longitudes de onda mayores según se van agregando las nanopartículas. Con el fin de tener un valor que indique cómo varía la estabilidad de las nanopartículas, se evalúa la relación de la absorbancia en el máximo del plasmón de superficie y la absorbancia a 600 nm, que dan información del estado de dispersión de la muestra (Figura 8). Este método permite de manera rápida evaluar las condiciones óptimas de funcionalización para tener un sistema estable.

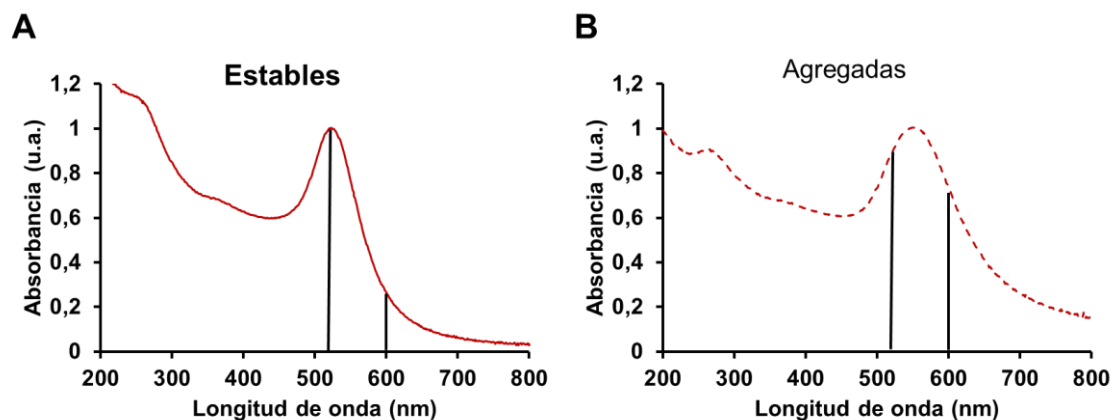


Figura 8. Espectros de UV-vis de AuNSs estables (A) y agregadas (B) y la correspondiente relación de absorbancia a 522 (LSPR) y 600 nm.

También, por electroforesis en gel se estudia la movilidad electroforética de las nanopartículas, que depende de su carga, tamaño y forma. Además, los materiales que presenten una menor estabilidad coloidal agregarán en los pocillos del gel o exhibirán bandas más alargadas. Cuando se evalúa en electroforesis en gel de agarosa la movilidad electroforética de las nanoesferas al ir aumentando la proporción de PEG-OMe se observa una disminución de la movilidad. Esto se explica por una disminución de la cantidad de grupos ionizables negativos y por lo tanto de la carga negativa de la nanopartícula (Figura 9). Sorprendentemente cuando se usa un 100% de PEG-OMe la nanopartícula siguen desplazándose hacia el polo positivo del electrodo, tal vez porque no se haya eliminado todo el citrato de la superficie.

## Capítulo 2

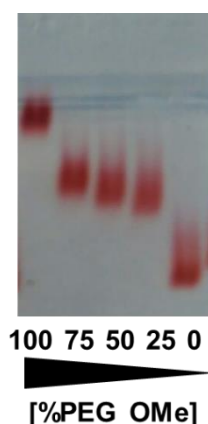


Figura 9. Gel de electroforesis del intercambio del citrato por PEG458 y PEG-OMe usando diferentes proporciones de ambos PEGs.

Asimismo, por espectroscopía UV-vis se comprueba que las nanopartículas se mantienen estables cuando el PEG-OMe está presente, con un coeficiente de estabilidad que se mantiene en torno a 3,8 (Tabla 2). Con respecto a la carga de la nanopartícula, se determina el potencial  $\zeta$  de los diferentes materiales. La carga superficial de la nanopartícula solo es distinta cuando la cantidad de PEG-OMe es más baja (Tabla 2, Ent. 5-6). Para proporciones superiores, se mantiene en torno a -28 y -33 mV. Además de la posible presencia de citrato es conocido que las cadenas PEG neutras proporcionan valores de potencial  $\zeta$  negativos a pesar de la ausencia de carga.

Tabla 2. Longitud de onda, cociente de la absorbancia de LSPR y absorbancia 600 nm, y potencial  $\zeta$  de las nanoesferas de 14 nm funcionalizadas con una mezcla de PEG metoxi y PEG458.

Entrada	OMe (%)	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$	Potencial Z (mV)
1	NS-Cit	520	4,7	$-31,0 \pm 3,0$
2	100	523	3,8	$-28,5 \pm 0,6$
3	75	523	3,8	$-33,2 \pm 0,8$
4	50	523	3,8	$-29,0 \pm 2,0$
5	25	523	3,8	$-36,2 \pm 0,4$
6	0	522	3,9	$-39,0 \pm 2,0$

Tras modular la carga, la segunda modificación es la introducción de una cadena alifática entre el grupo tiol y el PEG para aumentar la densidad del recubrimiento. Se selecciona el polímero comercial, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-PEG(12)-COOH (Figura 7, FA-PEG818) y se sigue el protocolo anteriormente descrito para el intercambio con el citrato. Se utilizan diferentes cantidades de polímero para evaluar cómo afectan a la estabilidad. Se eligen dos rangos de concentración de PEG, entre 0,16 y 1,95 PEG·nm<sup>-2</sup>, que es una concentración baja, inferior a la cantidad necesaria para cubrir toda la superficie. En el segundo rango se utilizan valores mayores, entre 6,5 y 11,4 PEG·nm<sup>-2</sup>, que es el rango donde se espera que las nanopartículas sean más estables. En este rango se llega a una saturación de la superficie. En la Figura 10, cuando se usa una baja carga de polímero (entre 0,16-1,81 PEG·nm<sup>-2</sup>) se observa la presencia de agregados en el pocillo, pero parte de las nanopartículas son estabilizadas. A partir de 1,95 PEG·nm<sup>-2</sup>, las nanopartículas se mantienen más estables y presentan una movilidad electroforética similar. Por otro lado, se realiza un análisis de estabilidad (Figura 10, C). A medida que aumenta la concentración de PEG el cociente de estabilidad  $A_{\text{LSPR}}/A_{600}$  se incrementa llegando a una saturación alrededor de 1,95 PEG·nm<sup>-2</sup> cuando los valores se mantienen constantes y cercanos a 3,4. Estos resultados confirman la tendencia observada en el gel de electroforesis. Se selecciona como condición óptima 6,5 PEG·nm<sup>-2</sup>, que supone la saturación completa de la superficie.

## Capítulo 2

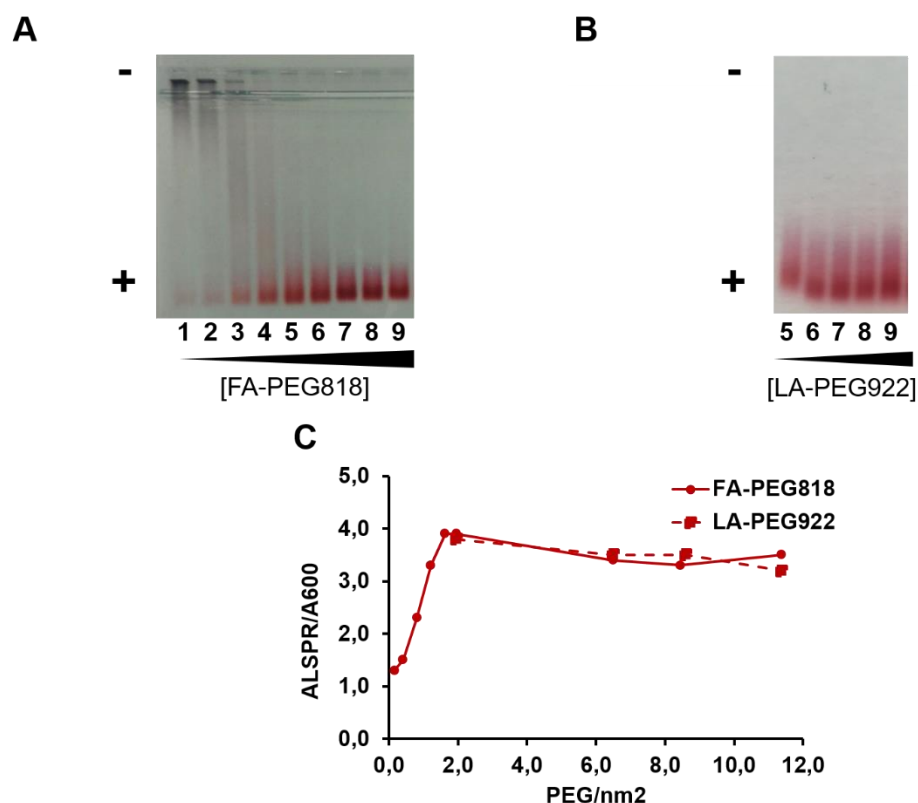


Figura 10. Gel de electroforesis del intercambio del citrato por PEG usando diferentes concentraciones para el FA-PEG818 (A) y el LA-922PEG (B) y relación de absorbancias a 522 y 600 nm en función de la cantidad de PEG/AuNS que se ha añadido para ambos polímeros(C). Nota: se seleccionan las siguientes concentraciones de polímero por superficie: 0,16, 0,41, 0,81, 1,22, 1,62, 1,95, 6,5, 8,4 y 11,4 PEG·nm<sup>-2</sup>, que corresponden a los números del 1 al 9 del gel de electroforesis.

En tercer lugar, se utilizan moléculas de PEG con dos grupos tiol para aumentar la estabilidad de la unión y así mejorar la estabilidad coloidal de la nanopartícula. Se elige trabajar con el LA-922PEG (Figura 7, LA-922PEG) ya que presenta tamaño similar a los polímeros anteriores (una masa de alrededor de 922 Da). Tras lo observado en el NS-FA-PEG818-DOX se descartan las concentraciones por debajo de 1,62 PEG·nm<sup>-2</sup> puesto que no se consideran suficientes para estabilizar la nanopartícula. Se eligen las concentraciones 1,95, 6,5, 8,4 y 11,4 PEG·nm<sup>-2</sup>. Se obtienen resultados similares al FA-PEG818 cuando se caracteriza por electroforesis en gel y UV-VIS. Por gel de electroforesis (Figura 10, B), la concentración más baja



de LA-PEG922 presenta menor movilidad que para el resto de las concentraciones, concluyendo en este caso que el número de cadenas para estabilizar la NSs se encuentra alrededor de  $6,5 \text{ PEG} \cdot \text{nm}^{-2}$ . Este resultado se confirma por UV-vis, ya que el valor  $A_{\text{LSPR}}/A_{600}$  se mantiene constante alrededor de 3,5.

### 2.1.2 Método de síntesis de los nanoclústers

Los nanoclústers (NCs), nanopartículas con diámetro menor a 3 nm, pueden comportarse de forma diferente a NPs de mayor tamaño, presentando propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas y catalíticas únicas.<sup>35</sup> A diferencia de las nanoesferas con citrato, las propiedades ópticas de los NCs no están dominadas por el plasmón localizado de superficie. Estos materiales poseen estados energéticos discretos que permiten la transición de electrones de naturaleza HOMO-LUMO, les confieren actividad catalítica y unas destacadas propiedades ópticas como una alta intensidad de luminiscencia.<sup>36</sup>

Los NCs son demasiado pequeños para que se puedan sintetizar utilizando la reducción con citrato. Se opta por el método desarrollado por Murray para la preparación de nanoclústers recubiertos con una molécula orgánica.<sup>37</sup> En la síntesis de Murray se utiliza un aminoácido no natural, la *N*-(2-mercaptopropanoil)glicina o tiopronina, que presenta un grupo tiol y un grupo carboxilo en su estructura. La tiopronina se utiliza como medicamento para el tratamiento de cistinuria y de artritis reumatoide. En esta metodología se prepara una disolución del precursor del oro con la tiopronina en una mezcla metanol/ácido acético dando lugar a una solución estable de color rojo (Figura 11). La reacción de reducción se realiza agitando a temperatura ambiente y usando como reductor el borohidruro sódico. Tras 30 min de reacción, el metanol se elimina por evaporación y se

## Capítulo 2

retira el resto de los subproductos por diálisis. La acidez de la disolución es crítica. En ausencia de ácido acético las nanopartículas formadas tras la adición de  $\text{BH}_4^-$  se agregan inmediatamente y de forma irreversible mientras el pH de la mezcla de reacción aumenta hasta pH 10 en contraste con el pH 5 del protocolo normal de síntesis.<sup>37</sup>

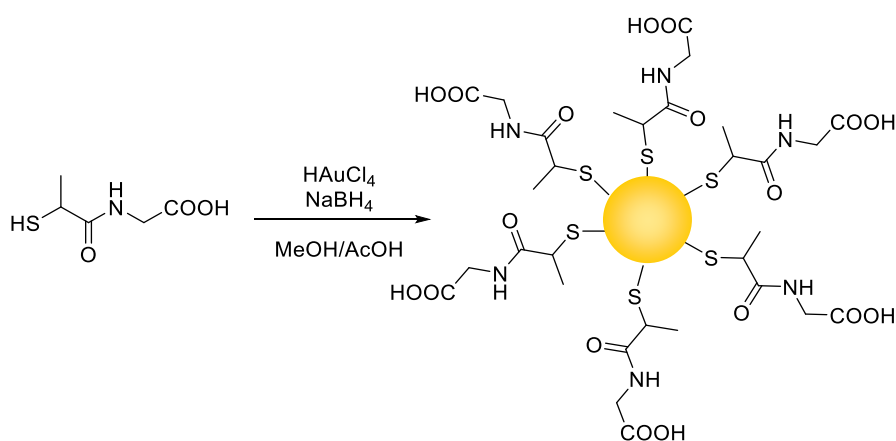


Figura 11. Esquema de reacción de síntesis de nanoesferas cubiertas de tiopronina por el método de Murray.<sup>37</sup>

Los AuNCs estabilizados con tiopronina se liofilizan para que se mantengan estables un mayor tiempo y se pueden resuspender en agua. Este material se caracteriza de forma similar a las nanoesferas de citrato. En la Figura 12, se presenta el espectro UV-Vis en el que no se observan bandas tan pronunciadas como para las nanoesferas de 14 nm. Debido a su pequeño tamaño se aprecia un pequeño hombro en torno a 500-600 nm, que corresponde a la banda de LSPR, tal y como está descrito en la bibliografía.<sup>37,38</sup> Por otro lado, mediante las imágenes de TEM se determina el diámetro de  $2,5 \pm 0,5$  nm, con lo que se concluye que estas nanopartículas presentan una baja polidispersidad.

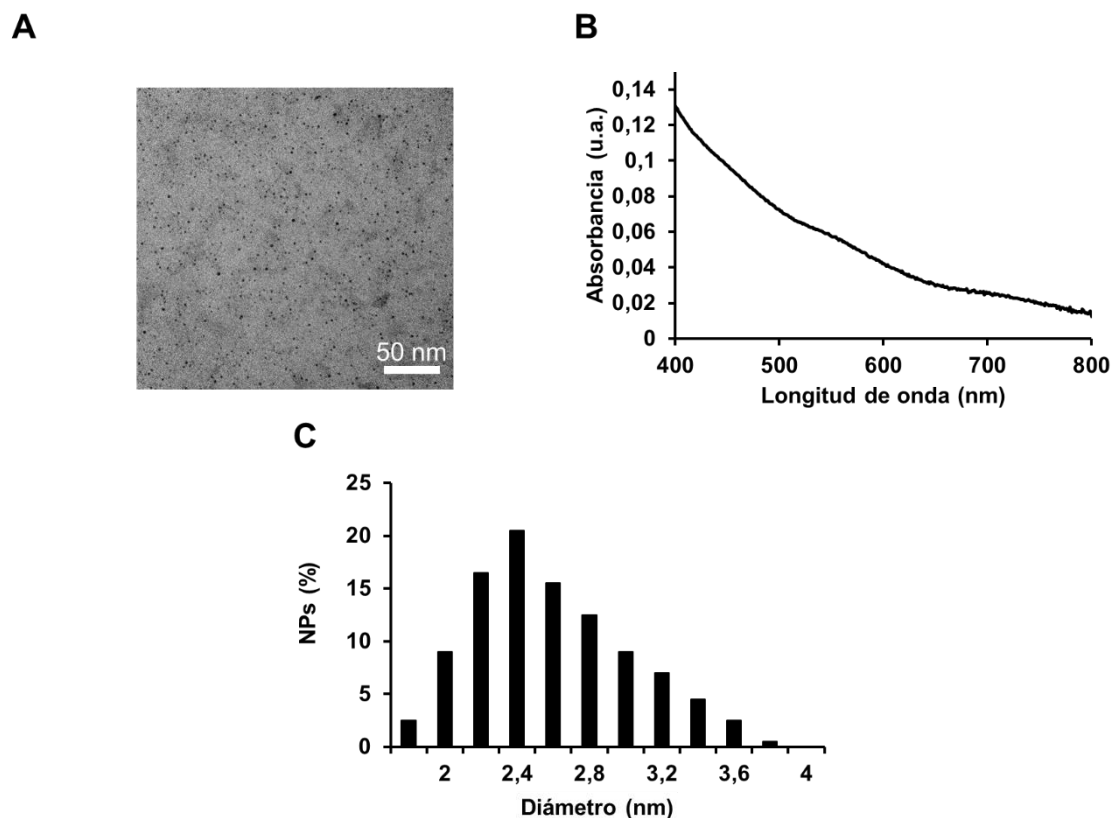


Figura 12. Espectro UV-vis (A), imagen de TEM (B) e histograma (C) de los nanoclústers estabilizados con tiopronina (NC-tiopronina).

### 2.1.3 Síntesis de los nanoprismas

El interés por el uso de nanoprismas de oro ha aumentado durante los años por sus ventajas con respecto a otras formas de nanopartículas de oro debido a que la banda de LSPR se encuentra en el infrarrojo cercano, que es considerado como la “ventana biológica” ya que los tejidos son más transparentes a radiaciones de 700-1200 nm.<sup>39</sup> AuNPrs pueden ser excitados en estas longitudes de onda y liberar la energía en forma de calor, lo que se puede utilizar para matar células cancerígenas selectivamente.<sup>40</sup> Este proceso se conoce como terapia fototérmica (PTT) y se aplicará en los próximos capítulos. Además, estas nanopartículas se han utilizado como amplificadores de la señal en espectroscopía Raman (SERS).<sup>41</sup>

## Capítulo 2

Para la preparación de los nanoprismas se elige una síntesis que evita el uso de surfactantes de forma que se pueda emplear el mismo método en las aplicaciones en terapia que se tratan en los siguientes capítulos.<sup>42,43</sup> La reducción de la sal de oro,  $\text{HAuCl}_4$ , con tiosulfato de sodio ha atraído el interés por su facilidad y rendimiento. Además, las nanopartículas quedan recubiertas por especies oxidadas del tiosulfato lo que permite un intercambio de ligando rápido comparado con otros métodos de síntesis que requieren el uso de surfactantes.<sup>44,45</sup>

En este método se realizan dos adiciones de tiosulfato sódico a un volumen de  $x$  mL del ácido tetracloroaurico (ac.) 2 mM (Figura 13). La primera adición de tiosulfato es siempre de  $1,2x$  mL de tiosulfato sódico 0,5 mM, independientemente del tamaño de los nanoprismas que se quieren obtener. Tras 5 min de reacción, el color de la disolución cambia de amarillo (ácido tetracloroaurico disuelto) a marrón. Este cambio de color indica la formación de AuNPs denominadas como semillas. La segunda adición se realiza 9 min después de la primera y se considera el paso clave para la formación de los NPRs. No obstante, en la bibliografía se encuentran otros ejemplos donde se realiza una única adición de tiosulfato sódico.<sup>46</sup> Además se puede utilizar yoduro de potasio como agente director del crecimiento de las nanopartículas.

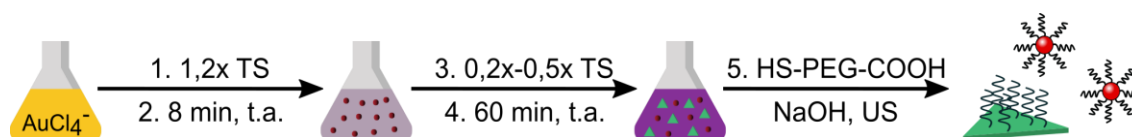


Figura 13. Esquema de reacción general de los nanoprismas por el método de la literatura (NPRs). Nota: TS = tiosulfato.<sup>45</sup>

La reacción se sigue por espectroscopía de UV-Vis-NIR, ya que la sal de oro presenta una banda centrada a 221 nm debida a Au (III). Dicha banda

desaparece a medida que la reacción avanza, mientras aparecen dos bandas que se corresponden con las bandas LSPR de las nanopartículas. Una banda aparece en el visible a alrededor de 530 nm y se debe a las nanoesferas formadas. Otra banda aparece en la región del infrarrojo cercano (NIR) aunque su posición concreta va a depender de la relación de aspecto de los NPrs (longitud de las aristas sobre el espesor,  $l/a$ ). Por lo general, el espesor de los NPrs es constante, alrededor de 9 nm, y la banda LSPR de los NPrs solo va a depender de la longitud de las aristas y de la posible formación de otras nanopartículas planas, por ejemplo, hexagonales.

Aunque este método había proporcionado buenos resultados en trabajos previos del grupo, no es completamente robusto. El éxito de la síntesis está muy influenciado por los reactivos, el pH del agua milli-Q, la temperatura o los reactivos.<sup>42,45</sup> Además, la adición de un aditivo como el yoduro potásico puede mejorar la selectividad de la síntesis. Por ello, para la preparación de los nanoprismas de diferentes tamaños se realiza una optimización de los diferentes parámetros de la síntesis como el volumen de la segunda adición (V2), la concentración de yoduro potásico ( $[KI]$ ), el número de adiciones y el tiempo entre adiciones (Tabla 3).

## Capítulo 2

Tabla 3. Parámetros que se han estudiado en la síntesis de NPRs.

		Condiciones de los experimentos					
		V1-1 (mL)	V1-2 (mL)	V2 (mL)	[KI] ( $\mu$ M)	Nº de adicion es	Tiempo entre adiciones
Grupos de experimentos	Grupo 1 - Volumen 2ª adición	1,2x		0,25x o 0,5x	0	2	8 min – 0 min
	Grupo 2- Efecto KI	1,2x		0,3x	0-5	3	8 min – 0 min
	Grupo 3 - Nº de adiciones	0,6x	0,6x	0,3x	5	3	4 min – 4 min
	Grupo 4 - Volumen 1ª adición	0,7x	0,7x	0,3x	5	3	4 min – 4 min
	Grupo 5 - Tiempo entre adiciones	0,7x	0,7x	0,3x	5	3	4 min – 2 min 4 min – 6 min 2 min – 4 min 6 min – 4 min

Este método es ideal para la preparación de nanoprismas de diferentes tamaños. En la síntesis de nuestro grupo, el volumen de la segunda adición varía entre 0,2x y 0,5x. De acuerdo con la experiencia previa del grupo, se seleccionan dos volúmenes para la segunda adición, 0,25x y 0,5x, esperando obtener nanoprismas con bandas de LSPR centradas a 750 y 1075 nm respectivamente (Tabla 3, Grupo 1). En la Figura 14 se representa el espectro UV-Vis-NIR tras 30 y 60 min, después de haber añadido los volúmenes 0,25x y 0,5x. Pasados 60 min se obtienen espectros muy similares en la zona NIR. Sin embargo, cuando se usa la cantidad más baja de tiosulfato (0,25x), la banda del precursor de oro a 221 nm no ha desaparecido lo que indica que no se ha reducido todo el oro inicial y que la reacción no se ha completado. Para confirmar esta hipótesis, se busca la reacción de oxidación-reducción formada:



Para una disolución de 100 mL de precursor de oro (200  $\mu\text{mol}$   $\text{HAuCl}_4$ ) se necesitan 75  $\mu\text{mol}$  de tiosulfato para reducir todo el Au (III) suponiendo que todo el agente reductor se oxida a sulfato. Sin embargo, la cantidad de tiosulfato que se usa son 72,5  $\mu\text{mol}$  por lo que el agente reductor es el reactivo limitante y es la razón por la que no se reduce todo el oro.

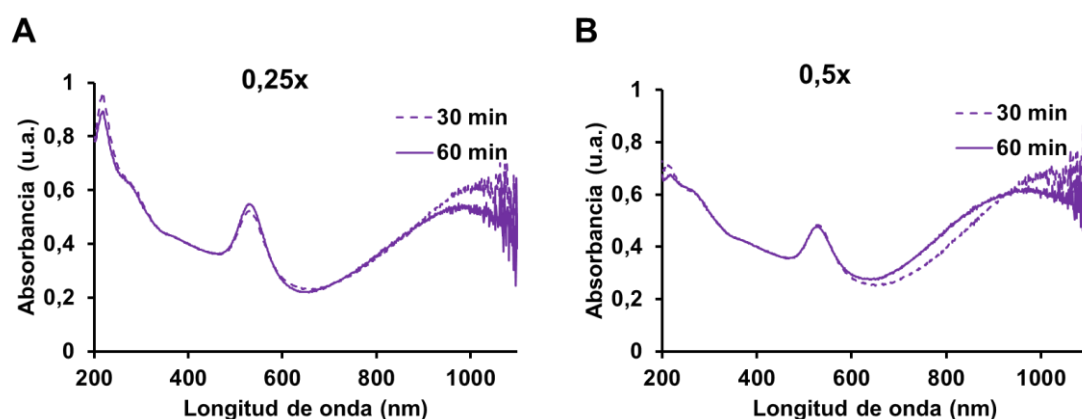


Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis-NIR de la síntesis de los nanoprismas (NPrs) tras las síntesis usando 0,25x (A), y 0,5x (B) mL de disolución de tiosulfato (0,5 mM).

Para el aislamiento de estos materiales se requiere un paso de funcionalización con PEG que estabiliza las nanopartículas y se mantiene el tamaño de las nanopartículas lo que se confirma mediante la fijación de la banda de LSPR. Las NPs se funcionalizan con el mismo PEG heterobifuncional, HS-PEG-COOH, que tiene un peso molecular de 5000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Se usan 0,5 mg de PEG por cada mg de NPs. Posteriormente, se añade NaOH hasta pH 12 para favorecer la reacción y se sonica durante 60 min a 60  $^{\circ}\text{C}$ . Las sales disueltas y el PEG que no ha reaccionado se eliminan por centrifugación. Tras los lavados, se observa que la banda LSPR se ha desplazado para ambas proporciones de disolución de tiosulfato quedando a 850 y 1000 nm para 0,25x y 0,5x mL respectivamente (Figura 15). No

## Capítulo 2

obstante, la relación de extinción entre los LSPR de NPrs y NSs queda por debajo de 2. Este valor indica que existe una alta proporción de esferas. Se considera una síntesis como buena cuando dicho valor es superior a 3.

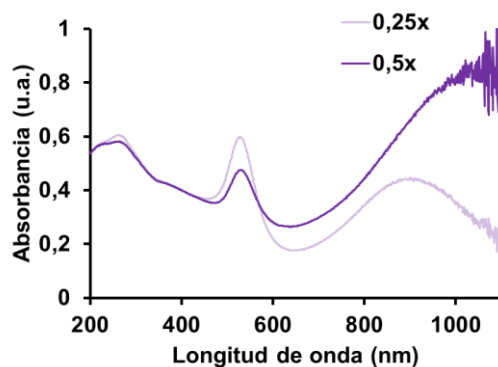


Figura 15. Espectro de absorción UV-Vis-NIR de la síntesis de los nanoprismas (NPrs) tras las síntesis usando 0,25x y 0,5x mL de disolución de tiosulfato (0,5 mM) (Grupo 1 en la Tabla 3), y después de funcionalizar con PEG heterobifuncional HS-PEG-COOH de 5000 g/mol (B).

En el siguiente grupo de experimentos, se ajusta la concentración de reductor para que se reduzca todo el oro (Tabla 3, Grupo 2). Para ello se aumenta el volumen de la segunda adición hasta 0,3x, que corresponde a un equivalente del precursor de oro. Asimismo, el yoduro en baja concentración ha demostrado favorecer la formación de nanoprismas (NPrs) en reacciones optimizadas para los nanobastones (NRs).<sup>47</sup> En el trabajo de Ha,<sup>48</sup> se estudió el efecto que tienen diferentes concentraciones de yoduro en la formación de NPrs y NRs. Las concentraciones superiores a 2  $\mu\text{M}$  evitaban la formación de NRs siendo 5  $\mu\text{M}$  la concentración crítica para favorecer la formación de NPrs. Esto se debe a que los haluros se adsorben específicamente sobre superficies de oro con bajo índice como Au (111), Au (110) y Au (100). En consecuencia, el crecimiento de los núcleos se produce por las otras caras. Además, se demuestra que el aumento de la concentración de yoduro



produce un cambio en la velocidad de reacción, favoreciendo la formación de NPRs más pequeños.

Se decide estudiar el efecto del yoduro potásico para favorecer la formación de los nanoprismas (Tabla 3, Grupo 2). Para ello, se usan diferentes concentraciones de KI (0, 2,5 y 5  $\mu$ M) obteniéndose los espectros de la Figura 16, A. El aumento de la concentración de yoduro favorece el desplazamiento de la banda LSPR a menores longitudes de onda, pero la relación entre extinciones de LSPR de NPRs y NSs se mantuvo por debajo 1,2. Debido al interés de preparar NPRs de un menor tamaño, se estabilizan con PEG los NPRs con la banda a 950 nm que se obtienen al usar 5  $\mu$ M de KI. Tras los lavados no se produce desplazamiento en la banda de LSPR, pero se mejora ligeramente la relación hasta 1,3. La baja selectividad de formación de los NPRs se puede explicar porque la reacción no se completa, no todo el tiosulfato pasa a sulfato y en condiciones de baja cantidad de reductor se favorece la formación de NSs.

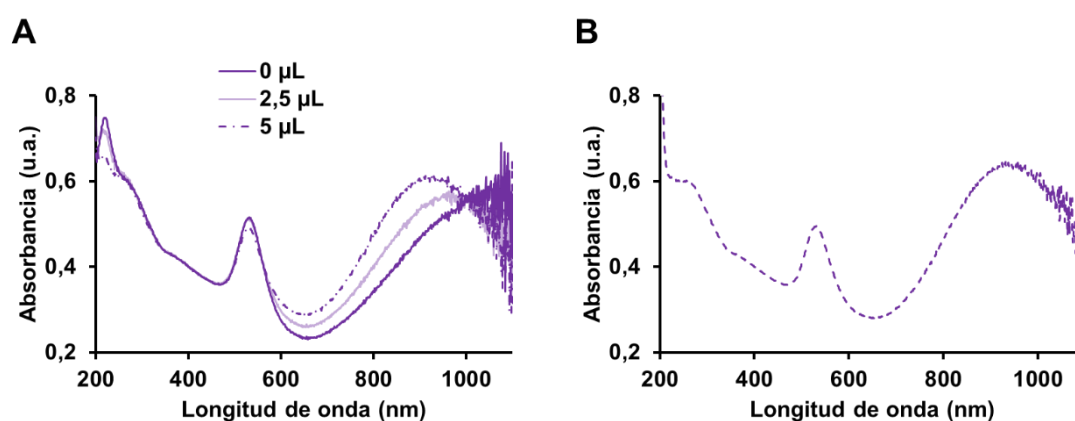


Figura 16. Espectro de absorción UV-Vis-NIR de la mezcla cruda tras la síntesis de los nanoprismas (NPrs) usando diferentes volúmenes de KI 0,1 M para concentraciones finales de 0, 2 y 5  $\mu$ M (A), y espectro final tras la PEGilación y los lavados cuando se usa 5  $\mu$ M KI (B).

## Capítulo 2

En el siguiente paso, se evalúa el efecto que tiene el número de adiciones para controlar la formación de los nanoprismas (Tabla 3, Grupo 3). Previamente, nuestro grupo había modificado el protocolo para obtener NPRs con bandas de LSPR en longitudes de onda superiores a 1100 nm. Para ello, la primera adición se dividía en dos pasos (TS1-1 y TS1-2) con un intervalo de 4 min.<sup>42</sup> Esto produjo una mejora en el rendimiento de la síntesis y los valores de las relaciones de NPRs/NSs eran superiores a 2. Esto se debe a que se reduce la máxima concentración efectiva de reductor y disminuye la cantidad de núcleos que se forman. Se sigue este método usando nuestras cantidades de tiosulfato y se obtiene un valor de 2 para la relación de extinción entre LSPR de NPRs y NS, muy superior a los 1,3 obtenidos previamente (Figura 17, A). Sin embargo, la longitud de onda del LSPR también aumenta. Por lo tanto, el desdoble de la primera adición, mejora la selectividad de la síntesis de nanoprismas, pero estos se obtienen con mayor tamaño.

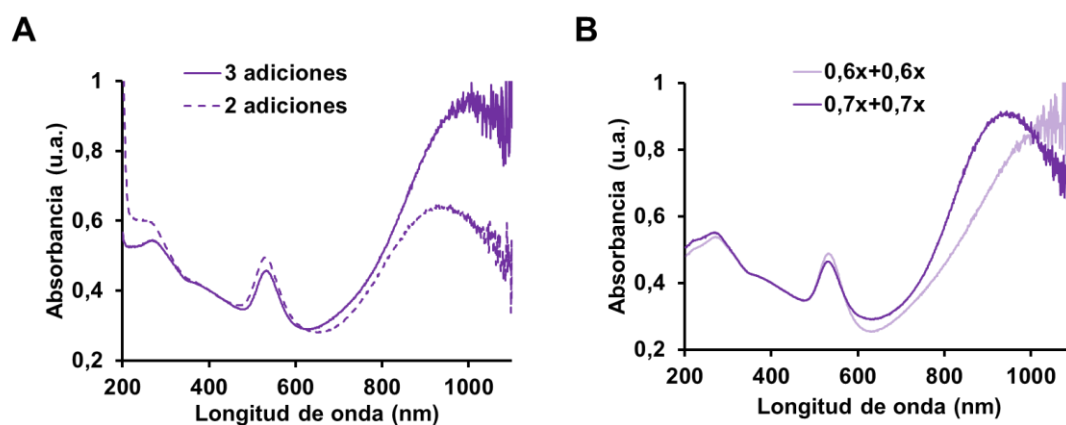


Figura 17. Espectro de absorción UV-Vis-NIR de la síntesis de los nanoprismas (NPRs) usando dos adiciones ( $1,2x + 0,3x$ ) o tres adiciones ( $0,6x + 0,6x + 0,3x$ ) (A) y diferentes volúmenes en la primera adición (B).

Con el objetivo de obtener NPRs con buena selectividad de forma, pero más pequeños, se opta por utilizar 3 adiciones (selectividad) pero

aumentando el volumen de reductor en las dos primeras con el objetivo de formar más núcleos o semillas y disminuir así el tamaño de las nanopartículas. Por lo tanto, se aumenta el volumen de las primeras dos adiciones (V1-1 y V1-2) de disolución de tiosulfato de 0,6x a 0,7x (Tabla 3, Grupo 4). El aumento de volumen de disolución de tiosulfato desplaza la banda a 950 nm y produce un valor de 2,3 en el cociente entre la absorbancia de las esferas. Nos referiremos a esta síntesis como M-NPrs (Figura 17, B).

Hasta ahora se preparan NPrs con banda LSPR mayores de 950 nm. En los experimentos en que se consigue sintetizar tamaños más pequeños, la relación NPrs/NSs siempre es alrededor de 1. Se plantea como hipótesis que un cambio en los tiempos entre adiciones podría modificar el tamaño de los NPrs (Tabla 3, Grupo 5). Para ello, se usan las cantidades con las que se obtienen los NPrs con LSPR de 950 nm y se seleccionan intervalos de 2, 4 y 6 min entre las tres adiciones, manteniendo siempre el intervalo de 4 min en algunas de las adiciones. Un aumento en el tiempo de incubación entre adiciones a 6 min produce que las bandas de LSPR se desplacen a valores por encima de 1000 nm (Figura 18). Esto se debe a que la concentración de reductor es mucho menor y se favorece la formación de un menor número de núcleos. Por otro lado, la disminución del intervalo entre adiciones a 2 min, produce una disminución de la banda de LSPR de NPrs, tal vez por el aumento de agente de reducción que se añade durante la formación inicial de los núcleos. Se concluye que el intervalo de adición afecta al tamaño que tienen estas nanopartículas. Por tanto, la concentración de agente reductor es un factor clave en las fases iniciales de la reacción.

## Capítulo 2

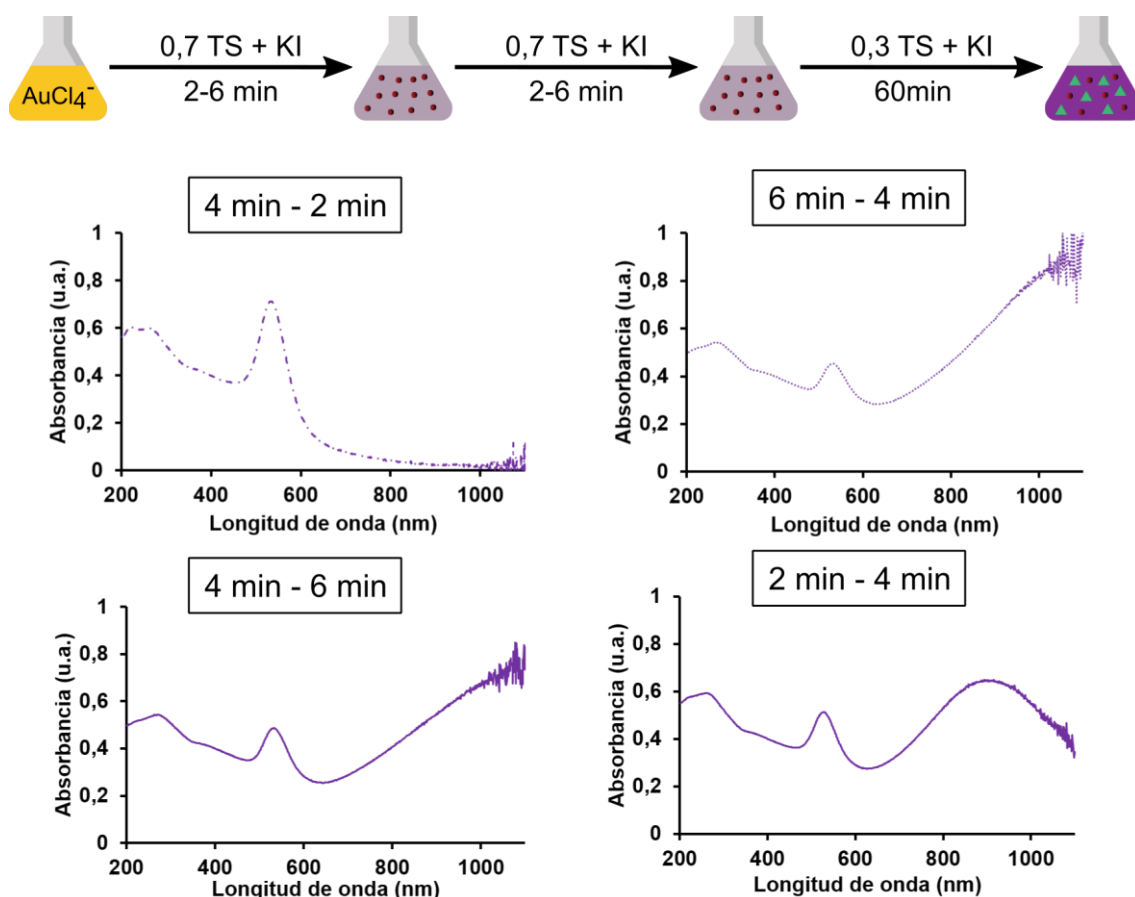


Figura 18. Espectro de absorción UV-Vis-NIR de la síntesis de los nanoprismas (NPrs) modificando el intervalo entre adiciones.

Con el objetivo de preparar nanoprismas con una banda LSPR en una longitud de onda menor de 950 nm se realizan una serie de modificaciones como el aumento de la cantidad de tiosulfato y la reducción del número de adiciones a dos. Ambas modificaciones buscan aumentar la concentración máxima de agente reductor, tiosulfato y así la cantidad de semillas que se forman y, así, conseguir nanopartículas de menor tamaño. Con esta modificación se obtienen unos NPrs con el LSPR centrado a 900 nm con una relación  $\text{NPrs/NSs} = 1,5$ . A partir de ahora nos referiremos a estas nanopartículas como nanoprismas pequeños o P-NPrs.

En la Tabla 4 se indican las condiciones que se utilizan finalmente para los tres tipos de nanoprismas, mientras que la descripción del procedimiento se incluye en la parte experimental.

Tabla 4. Condiciones seleccionadas para la síntesis de los nanoprismas.

<b>Material</b>	<b>V1-1 (mL)</b>	<b>V1-2 (mL)</b>	<b>V2 (mL)</b>	<b>KI (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Nº de adiciones</b>	<b>Tiempo entre adiciones</b>
<b>P-NPrs</b>	0,88x		0,88x	3,6	2	4 min
<b>M-NPrs</b>	0,7x	0,7x	0,3x	3,7	3	4 min – 4 min
<b>G-NPrs</b>	0,6x	0,6x	0,3x	4	3	4 min – 4 min

Los procedimientos descritos se escalaron hasta una cantidad de 40 mg de Au (III) y se hizo una caracterización más completa por UV-vis-NIR, gel de electroforesis y TEM. Para todos los materiales preparados se aprecia la presencia de dos bandas tal como se comenta previamente. La banda de LSPR que corresponde a las nanoesferas se mantiene en torno a los 530 nm en todos los casos, mientras que mediante las modificaciones de la síntesis se ha conseguido controlar la posición en el NIR de la banda LSPR de los nanoprismas (Figura 19A). La relación de NPrs/NSs se mejora al escalar el método y alcanza valores de alrededor de 2,8 para M-NPrs y G-NPrs, y 2,2 para P-NPrs. Asimismo, en el gel de electroforesis se observan dos bandas, una verde que se le asigna a los NPrs, y una rosada que se debe a las nanoesferas. Se aprecia que al aumentar el tamaño de la nanopartícula los NPrs tienen una movilidad electroforética menor y que los P-NPrs presentan una banda más estrecha debido a que tienen mejor menor dispersión.

## Capítulo 2

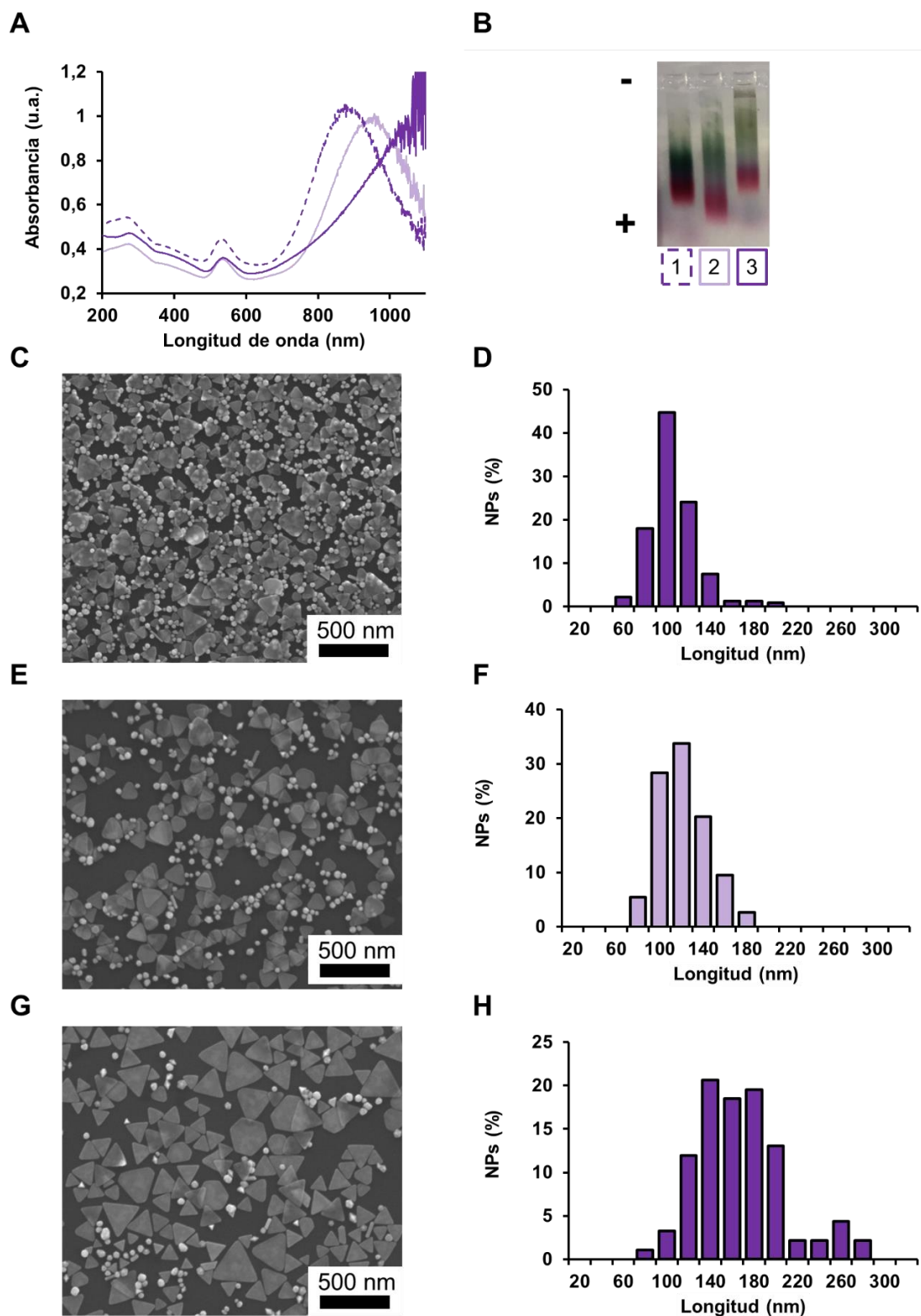


Figura 19. Espectro UV-vis-NIR (A) y gel de electroforesis (B) correspondiente a nanoprismas P-NPr/NS-PEG, M-NPr/NS-PEG y G-NPr/NS-PEG, 1-3 respectivamente. Microscopía electrónica de barrido (SEM) micrografía correspondiente a P-NPrs/NS-PEG (C), M-NPrs/NS-PEG (E) y L-NPrs/NS-PEG (G), respectivamente; e histogramas correspondientes a los nanoprismas P-NPrs/NS-PEG (D), M-NPrs/NS-PEG (F) y G-NPrs/NS-PEG (H) preparados, respectivamente. Las nanoesferas no se tuvieron en cuenta para los histogramas.

Las nanopartículas también se caracterizaron por SEM (Figura 19), obteniéndose longitudes de arista de  $96 \pm 23$ ,  $110 \pm 27$  y  $159 \pm 47$  correspondientes a los P-NPrs, M-NPrs y G-NPrs respectivamente. En todos los casos, se observa una polidispersidad en torno a 23-29%, mayor que en las nanoesferas de citrato y la presencia de una gran cantidad de nanoesferas, especialmente en el caso de P-NPrs. Esta observación se corresponde con la relación NPrs/NSs anteriormente comentada. Finalmente, se ha determinado mediante ICP el coeficiente de extinción a 400 nm en  $\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para los diferentes tamaños de los NPrs (Tabla 5). Al igual que en la nanoesferas este valor se mantiene en torno a  $11 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Tabla 5. Longitud de la arista de los nanoprismas P-NPr/NS-PEG, M-NPr/NS-PEG y G-NPr/NS-PEG respectivamente, y su masa correspondiente. Coeficientes experimentales de extinción determinados por ICP-AES.

Ent	Nomenclatura	LSPR (nm)	Longitud del borde (nm)	Masa NP ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$\epsilon_{400}$ ( $\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
1	P-NPr/NS-PEG	850	$96 \pm 23$	$4,08 \cdot 10^8$	12,5
2	M-NPr/NS-PEG	960	$110 \pm 27$	$5,36 \cdot 10^8$	11,7
3	G-NPr/NS-PEG	1100	$159 \pm 47$	$11,2 \cdot 10^8$	9,60

## 2.2 Funcionalización de nanopartículas con un intercalante de ADN

### 2.2.1 Funcionalización de las nanoesferas

Para el uso de las nanopartículas de oro en diferentes aplicaciones biomédicas es importante controlar la funcionalización de la superficie de los nanomateriales. Las moléculas que se unen modifican tanto las propiedades coloidales de la nanopartícula – carga, estabilidad, conformación del polímero – como sus propiedades biológicas para

## Capítulo 2

interaccionar con receptores u otras biomoléculas. En este apartado se estudiará la funcionalización de nanopartículas de oro con un intercalante de ADN. Se elige la doxorubicina como modelo para nuestra aplicación. Este principio activo inhibe la topoisomerasa II mediante la intercalación en el ADN. De esta manera se para la duplicación y transcripción del ADN a ARMm.<sup>49</sup>

La unión de la doxorubicina a la nanopartícula se realiza mediante la formación de un enlace amida entre la amina de la doxorubicina y el grupo carboxilo del PEG que recubre la nanopartícula (Figura 2). Esta reacción no transcurre de manera espontánea y requiere de la activación del grupo carboxilo mediante la reacción con una carbodiimida (Figura 20).<sup>50</sup> Puesto que las nanopartículas están dispersas en disolución acuosa, se utiliza una carbodiimida también soluble en agua, la 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), que reacciona con el carboxilato formando una *O*-acilisourea. Este intermedio no es estable y tiende a hidrolizarse en medio acuoso formando una urea N-sustituida.<sup>51</sup> Para obtener un intermedio más estable se utiliza habitualmente *N*-hidroxisuccidimida (NHS).<sup>52</sup> Sin embargo, NHS reduce la solubilidad y estabilidad de la nanopartícula al reducir el número de cargas totales tras formarse el intermedio de reacción. Por lo que se opta por *N*-hidroxisulfosuccidimida (sulfo-NHS) que permite preservar o aumentar la estabilidad en agua de la suspensión de los nanomateriales, al introducir cargas negativas sobre el intermedio de reacción.



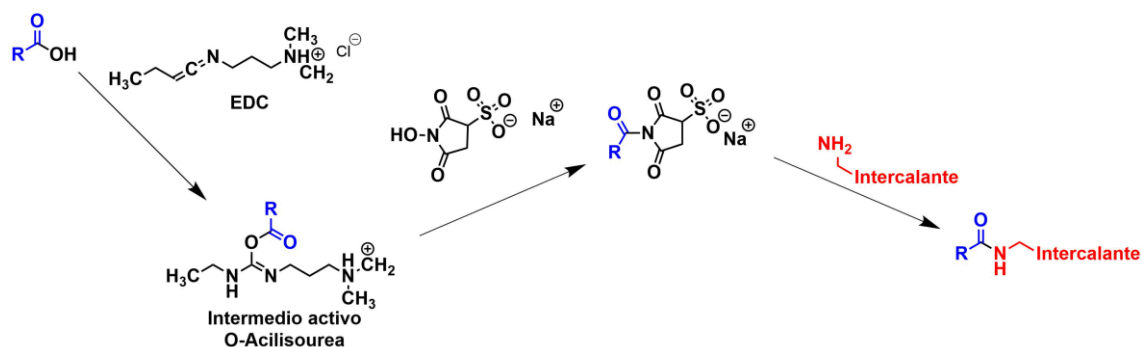


Figura 20. Esquema de la funcionalización de las nanopartículas por activación de los grupos carboxilos de la superficie con EDC y sulfo-NHS.

Para la optimización inicial de la funcionalización con DOX se seleccionan las nanoesferas de 14 nm estabilizadas con el PEG458 (NS-PEG458). Estas nanopartículas se han usado previamente para la funcionalización con diferentes moléculas.<sup>33,53,54</sup> El tampón de activación no debe contener ninguna amina primaria o grupo carboxilo, puesto que interferiría con la reacción de EDC. Se suele optar por usar el ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ya que otros tampones como fosfato pueden disminuir la reactividad de la carbodiimida. Se considera que la activación con EDC tolera un rango de pH 4-6 en reacciones con proteínas y péptidos puesto que por encima de ese pH aumenta la velocidad de hidrólisis del intermedio.<sup>55</sup>

Tras un proceso de optimización, se llega a un protocolo general en el que se divide la reacción de funcionalización en dos etapas. En la primera se activan los grupos carboxilos de la superficie de las nanopartículas con EDC y sulfo-NHS a pH 6. Esta reacción se realiza a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se añade la doxorubicina para funcionalizar un 10 % de los grupos carboxilos ( $0,5 \text{ DOX} \cdot \text{nm}^{-2}$ ). Los grupos que no han reaccionado se bloquean mediante la adición de un exceso de tris(hidroximetil)aminometano (Tris). De esta forma se eliminan grupos

## Capítulo 2

funcionales reactivos y susceptibles de hidrólisis y se sustituyen los grupos carboxilato cargados negativamente por grupos hidroxilos neutros.

La cantidad de doxorubicina unida se cuantifica a partir de los sobrenadantes mediante espectroscopía de fluorescencia ya que la concentración es muy baja para determinarla por espectroscopía de UV-vis. Se calcula que se une > 99 % de DOX con respecto a la añadida. Se sospecha que parte de la doxorubicina, muy hidrófoba, no se hubiera unido por enlaces covalentes (NS-DOX, no unida) y solo estuviera adsorbida en la superficie. Para comprobar nuestra hipótesis, se repite el mismo experimento sin activar las NPs. En esta ocasión se une un 87 %, por lo que se comprueba que los lavados con agua no son efectivos para retirar la doxorubicina unida por interacciones no covalentes. Se establecen estas condiciones con DOX pero sin activación con EDC o sulfo-NHS, como condiciones de control de unión inespecífica entre DOX y nanoesferas.

Con ese control se plantea cambiar la disolución de lavado para la eliminación de la DOX unida no covalentemente. Se selecciona una mezcla de KCl y Tween. De esta manera si las interacciones no covalentes son iónicas, las sales favorecerán la salida de la molécula. Por otro lado, si son debidas a interacciones hidrofóbicas, el surfactante desestabilizará dichas interacciones. Primero, únicamente se evalúa la estabilidad de las nanopartículas en disoluciones de KCl con diferente fuerza iónica (0,5 y 0,1 M) y en PBS para las NSs que tienen unida la doxorubicina por interacciones no específicas y mediante enlace covalente (Figura 21). Las NSs no funcionalizadas con DOX covalentemente son estables en las tres disoluciones evaluadas. Sin embargo, NS-DOX se agregan irreversiblemente en todas las concentraciones de KCl estudiadas, siendo KCl 0,1 M la mejor disolución de lavado. Se demuestra que las nanopartículas funcionalizadas

covalentemente con DOX pierden estabilidad coloidal y se requiere trabajar con concentraciones por debajo de las probadas.

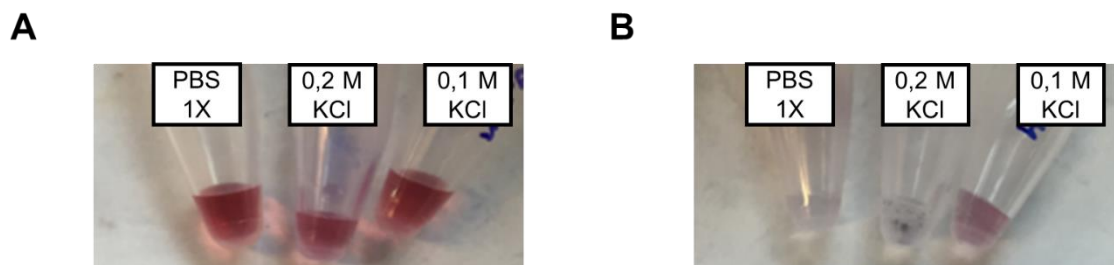


Figura 21. Estabilidad de las nanoesferas unidas por interacciones no específicas (izquierda) y por enlace covalente (derecha).

La disolución de KCl por encima de 0,1 M es negativa para la estabilidad de las nanopartículas cuando están funcionalizadas con doxorubicina. Se realiza otro experimento de funcionalización, esta vez usando como disolución de lavado NaCl 10 mM + Tween 0,01%, y se compara la estabilidad y la cantidad de doxorubicina presente en los sobrenadantes con respecto a un lavado con agua. Tras los lavados, las nanoesferas con doxorubicina unida por enlace covalente están más agregadas tanto en el lavado con agua como con NaCl comparado con las nanoesferas no activadas. Cabe destacar que el lavado con NaCl produce un mayor desplazamiento de la banda de plasmón de 522 nm (NS-PEG458): a 529 nm con el lavado con agua y a 534 nm con el lavado con NaCl (Figura 22). La unión de la doxorubicina se cuantifica por análisis indirecto de los sobrenadantes por espectroscopía de fluorescencia (Figura 22, B). No es posible cuantificar directamente ya que la doxorubicina se encuentra en una baja concentración en las nanopartículas y las nanoesferas desactivan la fluorescencia de las moléculas que tienen unidas.<sup>56</sup> A partir de los controles, es decir experimentos sin activación de los carboxilatos y lavados con agua

## Capítulo 2

con disolución de NaCl, se establece que los lavados con NaCl retiran casi un 90% la doxorubicina unida inespecíficamente. Los experimentos con activación con EDC y sulfo-NHS permiten conocer la cantidad de DOX unida covalentemente a las nanopartículas que es de 87 DOX/NP (moléculas de DOX por nanopartícula) que se corresponden con  $0,14 \text{ DOX} \cdot \text{nm}^{-2}$ .

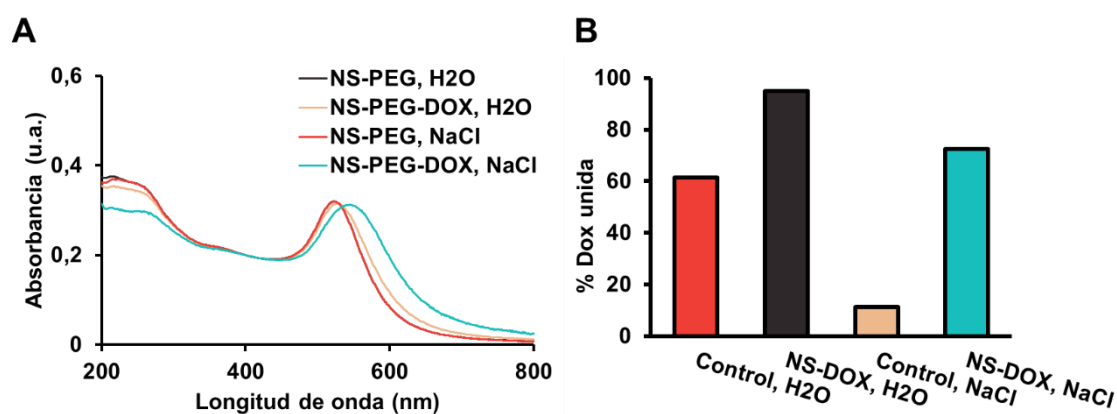


Figura 22. Espectro UV-vis de las nanoesferas funcionalizadas por doxorubicina que se lavan con agua o disolución de NaCl 10 mM + Tween 0.01% (A) y % de unión de la doxorubicina a la nanopartícula medido en los sobrenadantes de los lavados por espectroscopía de fluorescencia.

No obstante, las nanoesferas funcionalizadas con DOX no son suficientemente estables para los tampones que se usan habitualmente en SPRi para estudios de hibridación de ácidos nucleicos, tales como NaCl 50 mM +  $\text{MgCl}_2$  10 mM en MES o Tris 10 mM a pH 6. Para la mejora de la estabilidad de las nanopartículas se plantea usar dos estrategias: disminuir la cantidad de DOX o prescindir de la etapa de bloqueo. Se repite el experimento de funcionalización sin bloquear con Tris. Con esta modificación se consigue un aumento en la estabilidad de las nanopartículas, pero también se reduce la cantidad de doxorubicina que se une a los grupos carboxilos (Tabla 6). Se concluye que no se debe bloquear con Tris las

nanopartículas NS-PEG458, ya que el PEG458 no estabiliza suficientemente la nanopartícula.

Tabla 6. Experimento de funcionalización con doxorubicina bloqueando con Tris o no. Datos de espectroscopía de UV-vis y cuantificación de doxorubicina por espectroscopía de fluorescencia.

Ent.	Condiciones	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$	DOX unida
1	Tris, activado	526	3,4	71,2
2	Tris, no activado	523	3,0	12,5
3	No Tris, activado	523	4,5	47,7
4	No Tris, no activado	523	3,7	6,5

Se ha estudiado la estabilidad de estas nanoesferas funcionalizadas con DOX en el tampón que se utilizará para los estudios de hibridación en SPRi (Tabla 6). Se deja agitando en ese medio más de 3 horas y se observa agregación de las nanoesferas, quedando parcialmente adheridas a las paredes del Eppendorf. No obstante, la estabilidad ha mejorado bastante, ya que con el bloqueo con Tris se agregaban completamente en este medio tras una hora de agitación. Tras la incubación en el tampón óptimo, se midió la absorbancia de las muestras, obteniendo una clara disminución de la estabilidad tras las 4 horas de incubación (Tabla 7). Teniendo en cuenta que el tiempo de incubación con el híbrido ADNss:miARN será más corto, se considera que es una estabilidad adecuada.

## Capítulo 2

Tabla 7. Estudio de estabilidad de la nanoesfera con DOX en las disoluciones tampón de hibridación por espectroscopía de UV-vis después de 4 h. Nota: Los tampones de MES o Tris 10 mM a pH 6 contienen NaCl 50 mM + MgCl<sub>2</sub>.

Disolución tampón	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$
H <sub>2</sub> O	523	3,5
MES 10 mM	527	2,0
Tris 10 mM	527	2,0

Posteriormente, las nanoesferas estabilizadas con una mezcla de PEG458 y PEG-OMe se funcionalizaron con las mismas cantidades que se han usado para las nanopartículas con PEG458. La banda de LSPR se desplaza a 524 nm, pero el coeficiente de estabilidad no cambia con respecto a las nanopartículas no activadas (Tabla 8).

Tabla 8. Datos de la funcionalización de NS-PEG458-COOH/OMe-DOX Longitud de onda de la banda de LSPR, relación de la absorbancia de LSPR con respecto a la absorbancia a 600 nm.

Ent.	%OMe	%COOH	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	EDC/sulfo-NHS	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$
1	100	0	524	Activado	3,0
2			524	No activado	3,0
3	75	25	522	Activado	3,3
4			523	No activado	3,2
5	50	50	523	Activado	3,8
6			524	No activado	3,3
7	25	75	523	Activado	4,4
8			521	No activado	4,3
9	0	100	523	Activado	4,3
10			524	No activado	4,5

Los valores del coeficiente de estabilidad indican que al aumentar la proporción de PEG-OMe disminuye la estabilidad coloidal de las

nanopartículas funcionalizadas, probablemente por la menor repulsión electrostática entre nanopartículas. La estabilidad de las nanopartículas es mejorable en todos los casos.

Como se ha comentado anteriormente, la mejora de la estabilidad se puede conseguir mediante el uso de cadenas alifáticas, que formen una monocapa más densa en la superficie. Se elige un PEG que presenta dos grupos tioles para mejorar las interacciones con la superficie, NS-LA-PEG922 y se trata de funcionalizar las nanopartículas siguiendo el protocolo optimizado anteriormente, incluyendo el bloqueo con Tris. Sin embargo, en estas condiciones, no se consigue la funcionalización de NS-LA-PEG922 con doxorubicina (Figura 23, A).

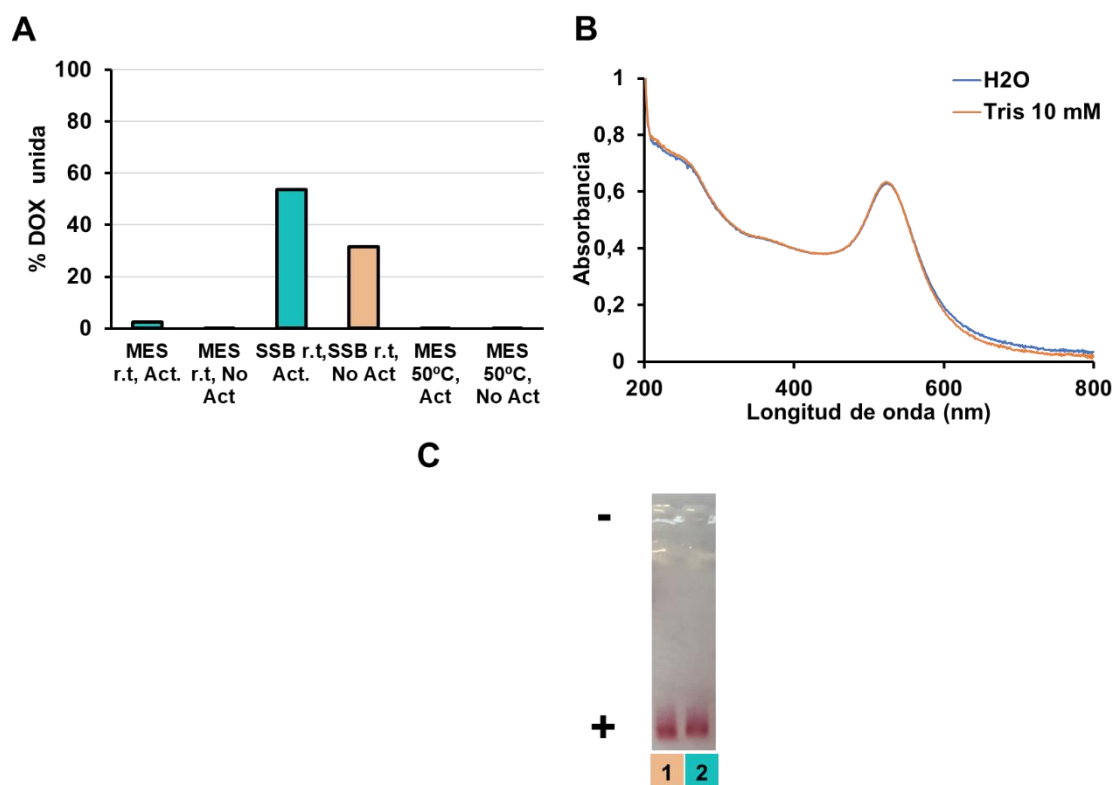


Figura 23. Gráfico de barras correspondiente a las diferentes estrategias de funcionalización de las NS-LA-PEG922 (A), espectro UV-vis de las NS-LA-PEG922-DOXy el control sin activar (B) y gel de electroforesis (C).

Para conseguir la funcionalización se siguen dos estrategias: aumento de la temperatura de reacción a 50 °C o utilización de tampón borato para

## Capítulo 2

aumentar el pH hasta 8 durante la fase de funcionalización. Con el aumento de la temperatura de reacción no se consigue la formación del enlace amida y se obtiene el sobrenadante con la misma cantidad de doxorubicina que se ha añadido (Figura 23, A). Asimismo, el aumento de pH produce una mejora en la funcionalización de la nanopartícula, por lo que se seleccionan estas condiciones para las futuras funcionalizaciones del LA-PEG922. La funcionalización de estas nanopartículas también se comprueba mediante gel de electroforesis, en el que se observa una reducción en la movilidad cuando la NP está funcionalizada covalentemente con doxorubicina (Figura 23, C). Una vez confirmada la funcionalización de las NPs, se determina su estabilidad en Tris 10 mM (Tabla 9). En esta ocasión, se produce una bajada menor del coeficiente de estabilidad, hasta 3,2. Se concluye que la estabilidad de estas nanopartículas es mucho mayor.

Tabla 9. Estudio de estabilidad de la NS-DT-PEG-DOX en las disoluciones tampón de hibridación por espectroscopía de UV-vis. Nota: El tampón Tris 10 mM a pH 6 contiene NaCl 50 mM + MgCl<sub>2</sub>.

Disolución tampón	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$
H <sub>2</sub> O	524	3,5
Tris 10 mM	524	3,2

Se plantea que el aumento de estabilidad podría deberse solo a la formación de una monocapa por la pequeña cadena alifática de la nanopartícula y no a la presencia de dos grupos tiol por ligando. El estudio con las nanopartículas estabilizadas con el polímero comercial, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-PEG(12)-COOH (NS-FA-PEG818) permitiría comprobar esta hipótesis puesto que el polímero tiene solo un tiol para el anclaje. En este caso la



funcionalización es efectiva a pH 6 y no es necesario el cambio de disolución tampón. Con la perspectiva de que el recubrimiento más eficiente proporcione una mayor estabilidad de las NS funcionalizadas con DOX se prueba a aumentar la cantidad de DOX que se añade por nanopartícula, en el intervalo entre 5-15  $\mu\text{g DOX/mg NP}$ . El aumento de la concentración de doxorubicina produce un pequeño desplazamiento de la banda de LSPR hasta 526 nm (Figura 24, B) pero el coeficiente de estabilidad se mantiene por encima de 3 para todas las NS por lo que las nanopartículas se mantienen estables en el rango de cantidades de doxorubicina estudiado (Tabla 10).

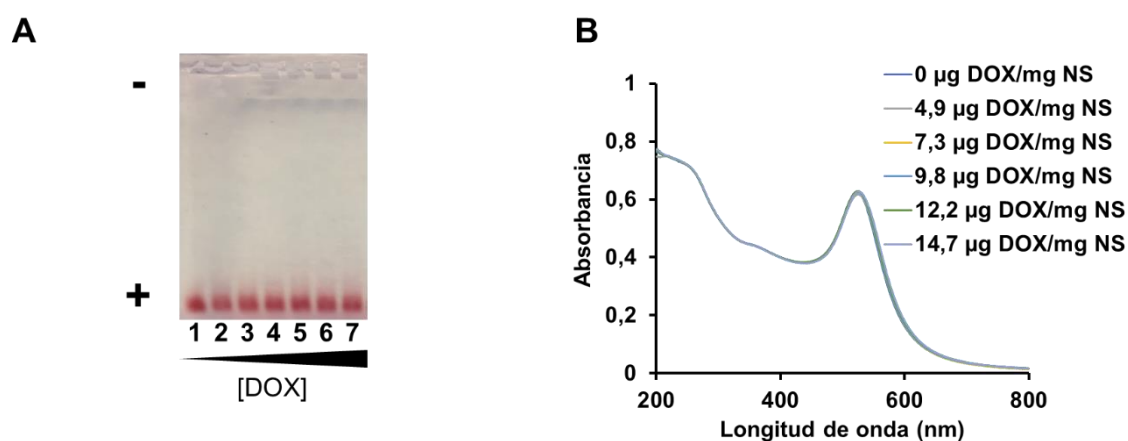


Figura 24. Gel de electroforesis (A) y espectro UV-vis correspondiente NS-FA-PEG818 funcionalizadas con doxorubicina diferentes concentraciones.

Sorprendentemente la movilidad de las nanopartículas no se ve afectada cuando se incrementa la concentración de intercalante. Tampoco se observa agregación en el gel de electroforesis y las bandas permanecen definidas (Figura 24, A). Esta tendencia confirma nuestra hipótesis de que el PEG estabiliza en mayor medida la NP cuando se utiliza un polímero con parte hidrofóbica cercana al grupo tiol. Cuando se cuantifica la DOX unida a las NS a partir de los sobrenadantes se observa que se produce una saturación cuando se añaden cantidades superiores a un 25% de los grupos carboxilos (Tabla 10).

## Capítulo 2

Tabla 10. Longitud de onda del LSPR, coeficiente de estabilidad o relación entre las absorbancias en la banda LSPR y a 600 nm, y cantidad de doxorubicina de la funcionalización de las NS-FA-PEG818 usando diferentes concentraciones de doxorubicina.

Ent.	% DOX añadida	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	$A_{\text{LSPR}}/A_{600}$	DOX/NPs	DOX·nm <sup>-2</sup>
1	10	523	3,8	72	0,12
2	15	523	3,5	105	0,17
3	20	524	3,7	133	0,22
4	25	526	3,6	227	0,37
5	30	526	3,4	236	0,38

### 2.2.2. Funcionalización de los nanoclústers

Tras el éxito de la funcionalización con las NS-PEG, se sigue con la funcionalización de los nanoclústers recubiertos con tiopronina (NC-tiopronina). La centrifugación no permite separar los NC-tiopronina de los reactivos que no hayan reaccionado. Entre las alternativas a la centrifugación se puede optar por la diálisis<sup>57</sup> o el uso de filtración asistida por centrifugación empleando amicones.<sup>58</sup> Los amicones son unas membranas desechables para la ultrafiltración asistida con la centrifugación para la concentración de muestras biológicas o proteínas. Existen de diferentes tamaños de poro de membrana y se selecciona la membrana con un tamaño de poro de 10kDa. La ventaja que tiene la separación por Amicones es que no requiere el uso de grandes volúmenes de agua, es un método rápido y se puede cuantificar la molécula que no ha reaccionado mediante el análisis del sobrenadante. En la funcionalización de las NS-tiopronina se usará el acoplamiento por carbodiimida de grupo carboxilo de la molécula de tiopronina.

Para seleccionar las condiciones de la funcionalización, se realizan unas pequeñas modificaciones del protocolo de activación de las nanoesferas de 14 nm. Se aumenta la concentración de NCs de 20 pmol hasta 10 nmol (0,2 mg Au) y así mantener la misma cantidad en masa de NPs. En trabajos previos,<sup>58</sup> se ha utilizado 1 mL de tampón MES 50 mM a pH 6,5 y cantidades similares de agentes activantes (0,48 mg EDC y 0,81 mg sulfo-NHS). Se selecciona etanolamina como agente bloqueante debido a su pequeño tamaño, por el que no presentará impedimentos estéricos que pudieran influir en la intercalación de la doxorubicina con la doble hebra ADN:ARN.

Se empieza funcionalizando un 5% de la superficie del NC y se cuantifica la cantidad de doxorubicina por medidas de fluorescencia de los sobrenadantes. Se ha realizado un control sin activar para determinar posibles interacciones inespecíficas de la doxorubicina. Se observa que tras la funcionalización la cantidad de intercalante unido a la nanopartícula es mayor en la funcionalización que en el control sin activar. No obstante, en el control sin activación se ha unido mucha doxorubicina de forma inespecífica (Figura 25, A). La estabilidad de estas nanopartículas es superior a las NS-PEG458 y permite el lavado con tampones fosfato y borato o con cloruro de sodio 0,2 M. Sin embargo, ninguna disolución tampón retira doxorubicina unida inespecíficamente. Para confirmar que la metodología funciona, se realiza un gel de agarosa aumentando el porcentaje de agarosa hasta un 4 % para aumentar la resolución y observar las pequeñas diferencias en la movilidad.<sup>59</sup> La movilidad de los NCs que se activaron por EDC/sulfo-NHS es menor que la de los NCs que tienen la DOX unida inespecíficamente por lo que se concluye que la funcionalización está funcionando (Figura 25, B).

## Capítulo 2

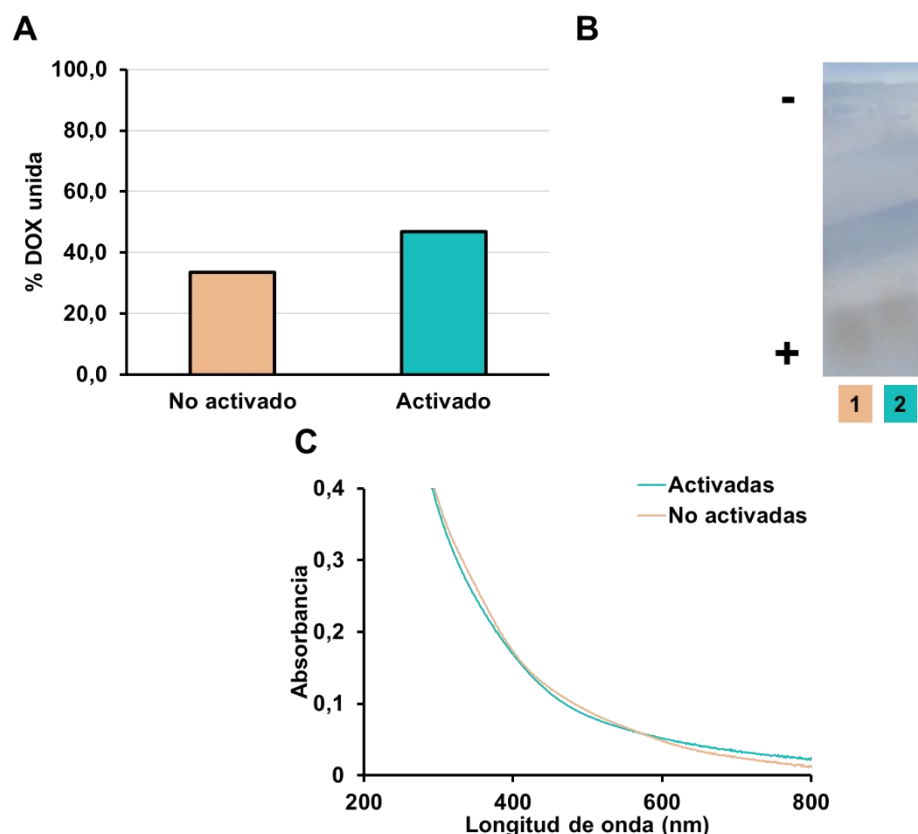


Figura 25. Gráfico de barras correspondiente al porcentaje de doxorubicina unida dependiendo del bloqueante usado (A), gel de electroforesis de 4% de agarosa siguiendo el mismo orden que en el gráfico (B) y espectro de UV-vis (C) de las NC-tiopronina-DOX.

Los NC-tiopronina-DOX son estables y se pueden liofilizar para guardarlos en la nevera para después redispersarlos en disolución acuosa cuando se necesitan. Se plantea si un aumento de la cantidad de doxorubicina afectaría a la estabilidad de las nanopartículas, por lo que se incrementan hasta un 10% los grupos carboxilos funcionalizados con el intercalante ( $0,31 \text{ DOX} \cdot \text{nm}^{-2}$ ). En este caso, con un aumento de la concentración del tampón de lavado de NaCl 1M, se pueden eliminar las interacciones inespecíficas (Figura 26, C). Tras la funcionalización y el bloqueo del resto de grupos funcionales con etanolamina (Figura 26, A, Bloqueante 1), las nanopartículas resultantes mantienen la estabilidad y se observa la aparición de un hombro entre 450-520 nm, que puede deberse a

la contribución de la doxorrubicina unida a la nanopartícula (Figura 26, B y D).

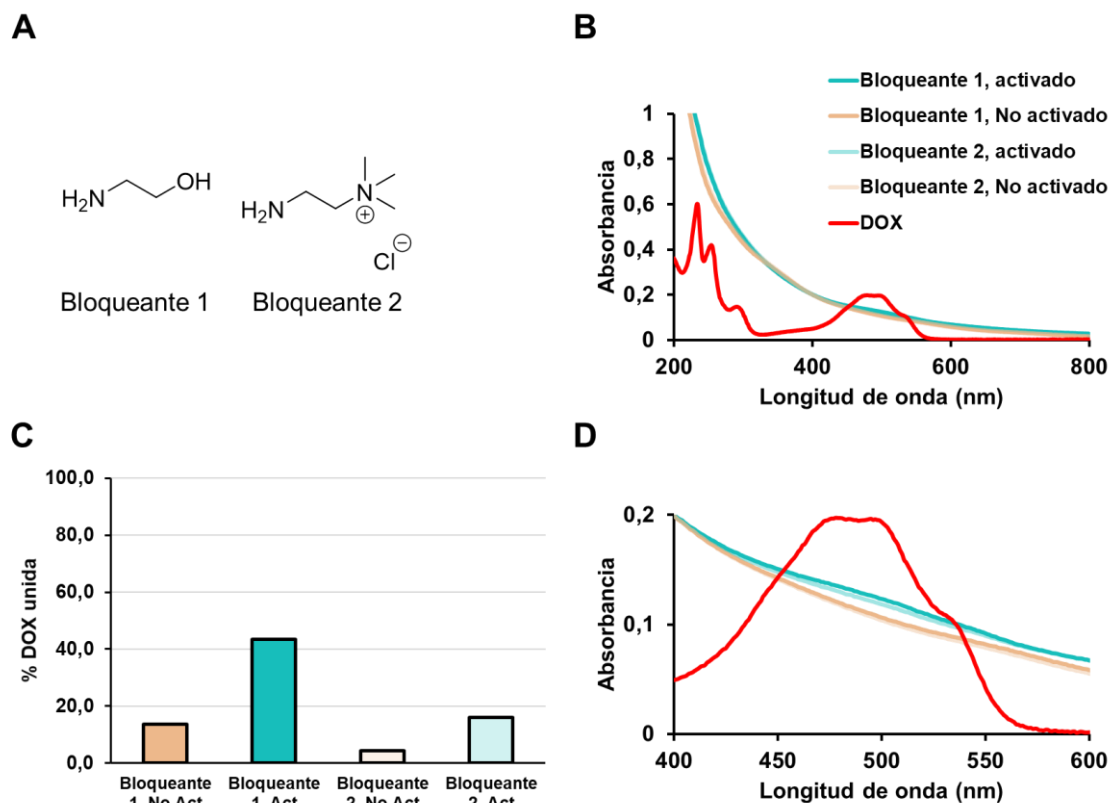


Figura 26. Estructuras de los dos agentes bloqueantes: aminoetanol y cloruro de 2-amino-*N,N,N*-trimetiletan-1-amonio (A) y espectro de UV-vis de las nanoesferas funcionalizadas con doxorrubicina, y bloqueadas con aminoetanol y 2-amino-*N,N,N*-trimetiletan-1-amonio, y espectro comparativo con la doxorrubicina sin funcionalizar (B). Resultados de la cuantificación de la DOX unida en cada caso (C). Ampliación del intervalo de longitudes de onda 400-600 nm de la figura B (D).

Dado que la carga de la nanopartícula puede afectar a la interacción de la doxorrubicina con la doble hebra de DNA, se selecciona el cloruro de 2-amino-*N,N,N*-trimetiletan-1-amonio (Figura 26, A, Bloqueante 2) para que la carga de la nanopartícula sea positiva (Figura 26 A). El bloqueo con el amonio cuaternario se realiza siguiendo el mismo protocolo que para la etanolamina. En el espectro de UV-vis se observa la banda correspondiente a la doxorrubicina, pero la intensidad de la banda es un poco menor. Esto se confirma midiendo los sobrenadantes de la funcionalización: uniéndose un

## Capítulo 2

40% en el caso del bloqueo con aminoetanol mientras que solo se une un 16% cuando se bloquea con el amonio cuaternario.

### 2.2.3 Funcionalización de los nanoprismas

En cuanto a la funcionalización de los nanoprismas de oro, encontramos diferentes ejemplos en la bibliografía como la funcionalización con carbohidratos,<sup>45</sup> péptidos<sup>60</sup> o incluso con doxorrubicina<sup>61</sup>. En este último ejemplo, la nanopartícula se funcionaliza con un oligonucleótido donde se intercala la doxorrubicina. Solo cuando se irradia con un láser, la doxorrubicina se libera y produce la muerte de las células.

Para la funcionalización con doxorrubicina continuamos utilizando la activación con EDC y sulfo-NHS como con las nanoesferas. Sin embargo, se modifican las cantidades de reactivos siguiendo el protocolo de Pelaz et al.<sup>45</sup> 0,5 mg NPrs-PEG se activan con 0,5 mg de EDC y 1,5 mg de sulfo-NHS. Tras la activación de los grupos carboxilos se añaden 10 nmol de doxorrubicina para funcionalizar un 10% de los carboxilos y se dejan reaccionar en condiciones de incubación a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se bloquean con Tris los grupos carboxilos que no han reaccionado. En la Figura 27 se presenta el espectro UV-vis en el que se observa la presencia de los M-NPrs-PEG (Figura 27, A) y G-NPrs-PEG (Figura 27, B) mezclados con las NSs. Tras la funcionalización las nanopartículas son estables y no se produce un desplazamiento de la banda LSPR ni para las NSs ni para los NPrs. Mediante la electroforesis en gel se pueden estudiar los cambios de movilidad de las nanopartículas y se comprueba que tanto para los nanoprismas como para las nanoesferas se reduce cuando se funcionalizan con la doxorrubicina (Figura 27, D). No obstante, la cuantificación de la DOX en los sobrenadantes pone de manifiesto que en estas condiciones las

cantidades de doxorrubicina que se unen a la nanopartícula son menores del 10% (Figura 27, C).

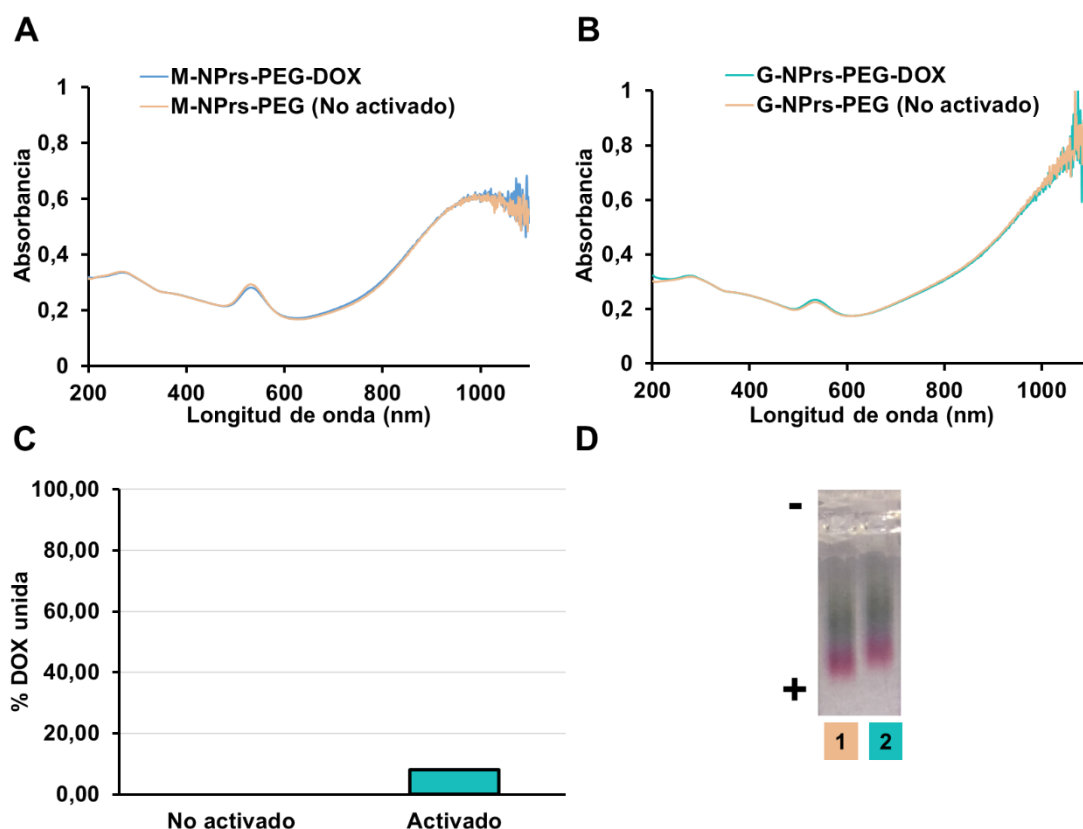


Figura 27. Espectro de UV-vis de los M-NPrs-PEG (A) y G-NPrs -PEG (B) tras la funcionalización con doxorrubicina. Gráfico de barras de la cuantificación de doxorrubicina en el sobrenadante (C) y gel de electroforesis (D) correspondiente a la funcionalización de los M-NPrs-PEG.

## 2.3 Uso de nanopartículas de oro como amplificadores de la señal de SPR

Inicialmente, se comienza el estudio de amplificación de SPRi con las NS-PEG458-DOX, que presentaban baja estabilidad en los tampones de hibridación. Se analiza la secuencia de miR422 que se ha sugerido como potencial biomarcador de esclerosis múltiple.<sup>62,63</sup> En distintas posiciones del SPRi se colocan un ADN complementario de miARN422 y una hebra de poli A de la misma longitud que actúa como control negativo para analizar las

## Capítulo 2

posibles interacciones inespecíficas de la cadena de miARN o las nanopartículas. Se añade la secuencia de miARN en tampón PBS 10 mM+ Tween 0,01% (Figura 28, A). En el control no se produce una variación en la señal lo que indica que no hay interacciones no específicas del analito ni con la superficie del sensor ni con poli A. Sin embargo, la adición de miARN422 (analito), complementario a la hebra de DNA unida en el sensor (sonda de captura), sí que produce un cambio en la señal SPR como resultado del emparejamiento de la sonda de captura con miARN422. Posteriormente, se añade doxorrubicina 500 nM, lo que produce el aumento esperado de la señal al intercalarse en la doble hebra de ácidos nucleicos. En el control no hay variación en la señal lo que indica que tampoco hay interacción no específica de DOX con la sonda de captura o la superficie del sensor. Posteriormente, se lava el sensor para retirar la DOX sin romper el emparejamiento entre la sonda de captura y el analito, y se añade NS-PEG458-DOX. En este caso hay un cambio en la señal tanto en el experimento como en el control, lo que indica que hay interacciones no específicas. El cambio es una disminución, que puede deberse a una interacción no deseada entre el plasmón de la superficie del sensor y el plasmón localizado de superficie de las nanopartículas.



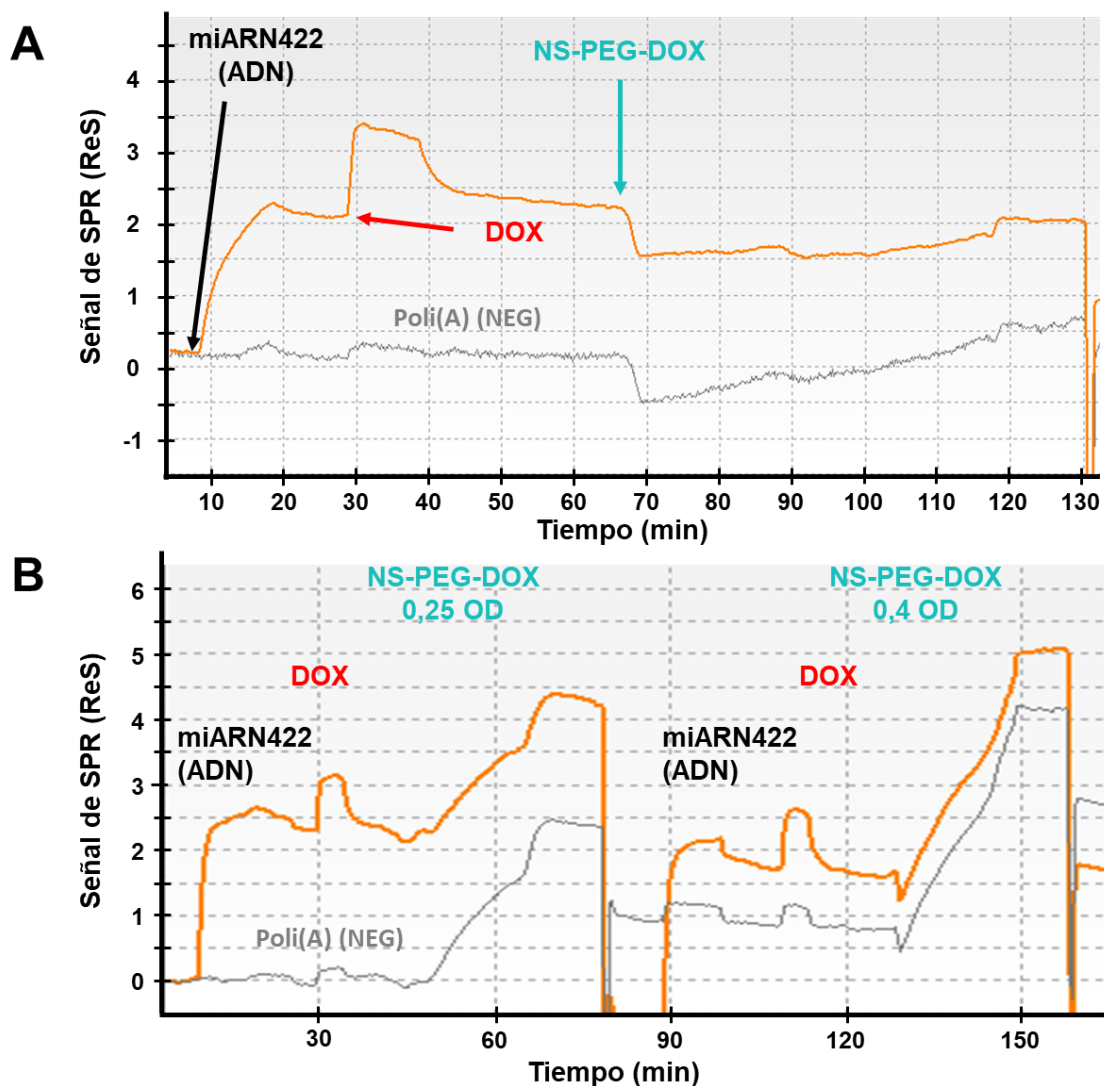


Figura 28. Amplificación de la señal de SPRi de NS-PEG458-DOX en tampón PBS 10 mM+ Tween 0,01%. (A) Amplificación de la señal de SPRi a diferentes concentraciones de NS-PEG458-DOX en tampón Tris 10 mM+ NaCl 50 mM + MgCl<sub>2</sub> 10 mM (B). Nota: Las flechas de la Figura indican el momento de adición de cada componente (miARN422, DOX y NS-PEG-DOX).

Para tratar de mejorar la conjugación de las NS-DOX con la doble hebra de ácidos nucleicos se sustituye el tampón PBS por Tris 10 mM+ NaCl 50 mM + MgCl<sub>2</sub> 10 mM (Figura 28, B). El cambio de tampón no afecta a la hibridación ADN:ARN. Cuando se añaden las nanopartículas se produce un aumento de hasta dos veces de la señal. Sin embargo, el incremento no es específico ya que la señal en la posición de poli(A) aumenta en las mismas

## Capítulo 2

unidades. Se piensa que un cambio de recubrimiento podría mejorar la interacción de las nanopartículas con las cadenas de ADN. Para el siguiente experimento, se cambia la estrategia para determinar la amplificación de la señal de SPR. En esta ocasión, se añaden las nanopartículas sobre la superficie funcionalizada solo con la sonda de captura para evaluar las interacciones inespecíficas de las nanopartículas. A continuación, se lava para retirar las nanopartículas y se añade la cadena de miARN. Finalmente, se añaden otra vez las nanopartículas y se determina la amplificación de la señal (Figura 29).

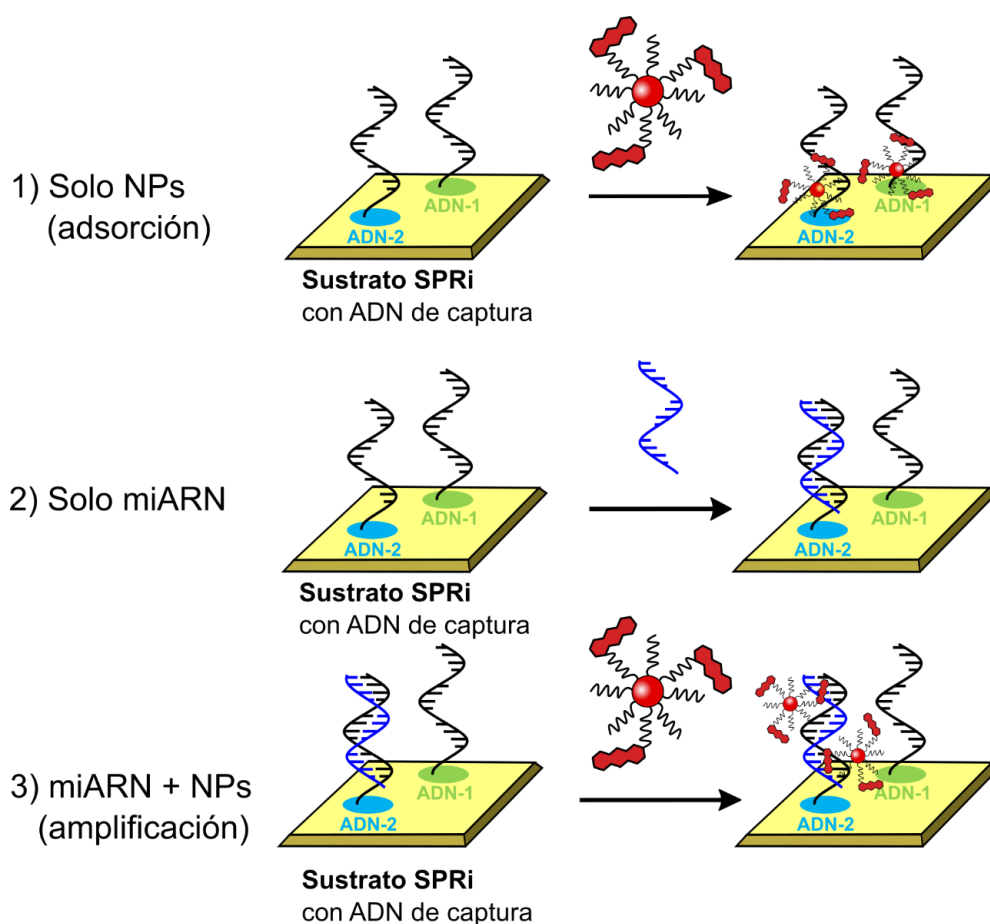


Figura 29. Estrategia aplicada para determinar la amplificación de la señal de SPRi. En el primer paso, se añaden las nanopartículas al sustrato con ADN de captura para determinar las interacciones inespecíficas. Posteriormente, se lava, se añade la hebra de miARN para que hibride con el ADN de captura para determinar el aumento de señal sin nanopartículas. Finalmente, se añaden las nanopartículas y la hebra de miARN para estudiar la amplificación de la señal de SPRi.

En la Figura 30, se muestran los resultados para las diferentes nanoesferas de oro. En esta ocasión, se han utilizado tres cadenas de miARN: miARN422, miARN572 y miARN126. Esta última secuencia es de control y no debería producirse incremento de la señal de SPR. En un primer paso, se añaden las nanopartículas para evaluar interacciones no específicas con la superficie del sensor y la sonda de captura cuando no ha habido detección de analito. Se puede observar que los NCs-tiopronina-DOX tienen fuertes interacciones inespecíficas puesto que producen un cambio de la señal. Por el contrario, los materiales derivados de NS apenas producen cambio de señal salvo en el caso de NS-FA-PEG818-DOX para las que la señal disminuye. El hecho de que las NS a diferencia de los NCs-tiopronina están siempre recubiertas de PEG, polímero con carácter antiadherente, podría explicar esta diferencia en el comportamiento. Sorprendentemente, para los NC-tiopronina se observa un cambio menor con el bloqueante 2, que tiene una carga positiva que en principio debería aumentar la interacción no específica, en este caso iónica, con la sonda de captura.

## Capítulo 2

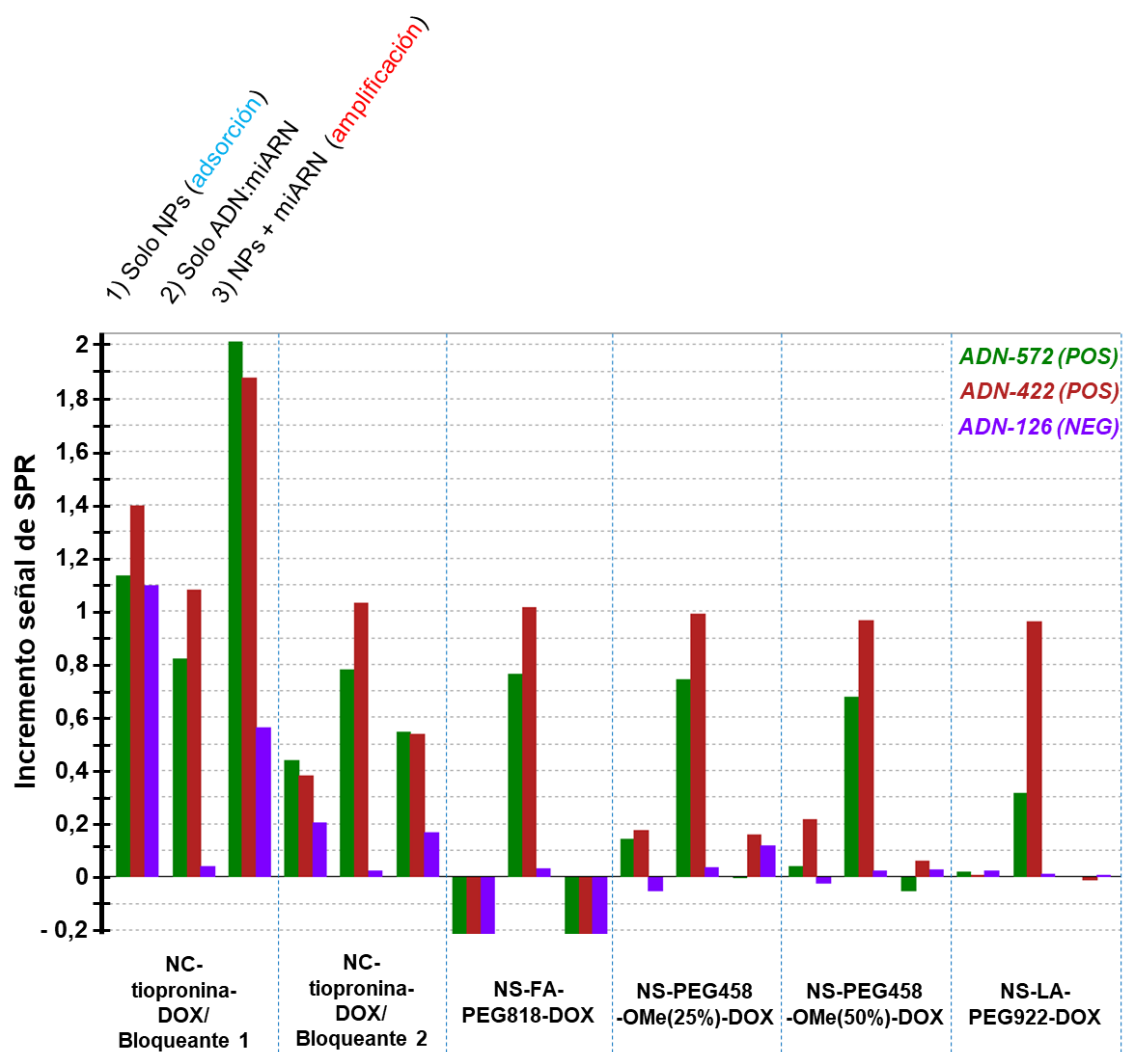


Figura 30. Amplificación de la señal de SPRi con nanoesferas funcionalizadas con doxorubicina según la secuencia de adiciones y lavados que se indica en la Figura 29.

Después de lavar la superficie para retirar las nanopartículas, en un segundo paso se añade la disolución de analito. Como es de esperar en los casos en los que el analito se corresponde con la sonda de captura (miARN572 y miARN422) hay un aumento de señal mientras que en el control negativo no hay variación. Una vez que se ha producido el reconocimiento del analito, se añaden las nanopartículas funcionalizadas con DOX para evaluar si se produce amplificación de señal.

Con respecto a las NS, la disminución de la carga de la nanopartícula utilizando cadenas PEG-OMe no produce una mejora de la señal de SPR. Probablemente esto es consecuencia de que la doxorubicina se encuentre aún menos expuesta.

Para las nanopartículas recubiertas con NS-FA-PEG818 o NS-LA-PEG922, se produce una interacción casi nula con la superficie del sensor, lo que puede deberse a que, debido a su hidrofobicidad, la doxorubicina interaccione con la parte alifática del recubrimiento y en consecuencia no se encuentre nada expuesta.

Por otro lado, NC-tiopronina-DOX sí proporcionan un aumento de la interacción de la nanopartícula con la doble hebra ADN:ARN que excede el observado por interacciones no específicas con la superficie del sensor y la sonda de captura. Aunque la amplificación de señal en el control denota que existen interacciones inespecíficas, la amplificación para los analitos miARN572 y miARN422 es hasta 2 veces superior. La mejora en la amplificación se puede explicar por dos motivos. En primer lugar, el recubrimiento de los nanoclúster con una molécula pequeña como la tiopronina hace que la doxorubicina esté más accesible para interaccionar. Por otro lado, el menor tamaño de los NC comparado con las NS podría favorecer que se uniera un mayor número de nanopartículas.

En la Figura 31, se presentan los sensogramas de los nanoprismas de oro M-NPrs-PEG-DOX y G-NPrs-PEG-DOX. Cuando se utiliza una concentración 0,25 OD de estas nanopartículas, no se produce interacción con las cadenas de ADN. Un aumento de concentración hasta 0,5 OD produce una interacción de las nanopartículas con las cadenas de ADN que se traduce en una disminución de la señal de SPR, tal vez porque los NPrs estén interaccionando con el ángulo de refracción del láser. Este resultado preliminar y el hecho de que el material es una mezcla de nanoesferas y

## Capítulo 2

nanoprismas de oro provoca que no se siga con estos experimentos. Para futuras aplicaciones sería interesante que estos materiales se pudieran separar y ver el efecto únicamente de los NPrs.

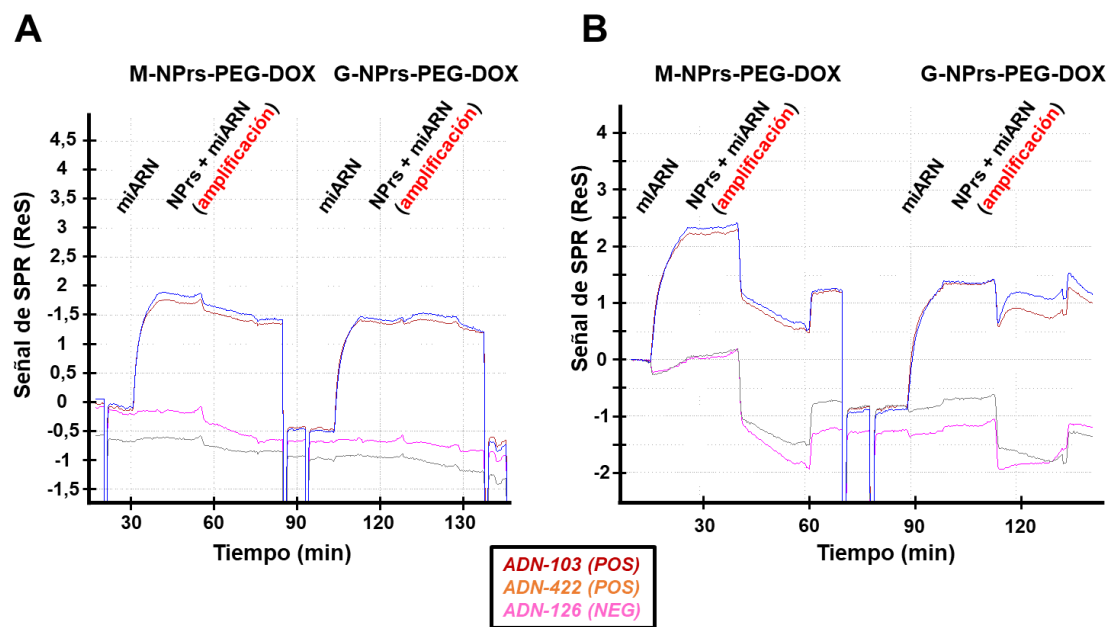


Figura 31. Amplificación de la señal de SPRi con nanoprismas funcionalizados con doxorubicina M-NPrs-PEG-DOX (izquierda) y G-NPrs-PEG-DOX (derecha), a dos concentraciones diferentes 0,25 OD (A) y 0,5 OD (B).

Nuestros experimentos muestran que la doxorubicina es eficaz para amplificar la señal de SPR de forma específica (Figura 28). Sin embargo, cuando se encuentra unida a las nanoesferas o no se observa amplificación (NS) o esta no es específica. Después de los experimentos realizados creemos que esto puede deberse a tres efectos.

- 1) La DOX no está expuesta para intercalarse porque está inmersa en el recubrimiento de la NP debido a su carácter hidrófobo;
- 2) Las interacciones no específicas en el caso de NC-tiopronina en los cuales la DOX sí que estaría expuesta.

3) Interacción negativa del plasmón localizado de superficie de las nanopartículas con el plasmón de la superficie del sensor como se aprecia en algunos de los experimentos de control.

Para una mejora en la amplificación de la señal se necesitan moléculas que presenten mayor selectividad por el híbrido ADN:ARN y con una masa molecular mayor, de forma que la molécula quede necesariamente expuesta. En este sentido, en el marco del mismo proyecto, se ha estudiado la posibilidad de usar un anticuerpo que reconozcan el híbrido ADN:ARN (anticuerpo monoclonal anti-híbrido ADN:ARN). Los estudios son parte de los resultados de una tesis doctoral<sup>64</sup> y un artículo.<sup>65</sup> En este caso el reactivo de amplificación sigue siendo universal puesto que el anticuerpo puede detectar cualquier híbrido ADN:ARN. Para la unión de las nanopartículas al anticuerpo se utiliza la química de afinidad con neutravidina unida a las nanopartículas y el anticuerpo biotinilado (Figura 32). En este estudio observamos que el anticuerpo era capaz de amplificar la señal hasta 10 veces. Cuando se utilizaba la conjugado nanopartículas con el anticuerpo unido a la neutravidina se obtuvo una amplificación de hasta 24 veces de la señal. Se determinó que el límite de detección LOD para diferentes secuencias de miARN (miR-422, miR-223, miR-126 and miR-23a). Dichas secuencias son potenciales biomarcadores de la esclerosis múltiple.<sup>62,63</sup> Se obtuvieron valores de LOD en el rango de pM (0,55 pM para miR422, 0,88 pM para miR-223, 1,19 pM para miR-126 y 1,79 pM para miR-23a). Los resultados apuntan a que las diferentes cadenas no afectan a la estrategia de amplificación universal.

## Capítulo 2

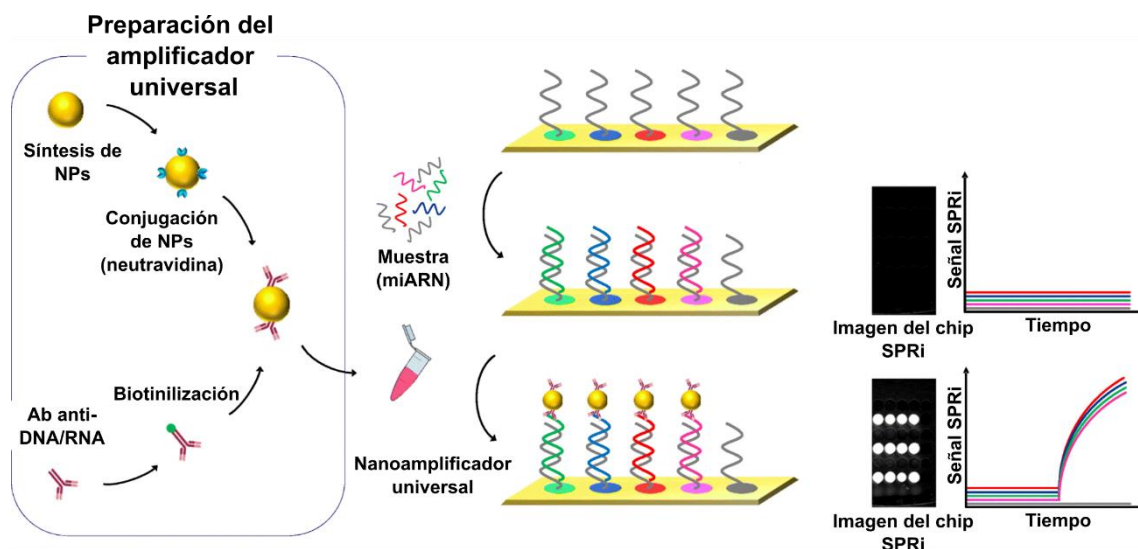


Figura 32. Representación esquemática de la estrategia usada para la detección simple y múltiple de miARN usando las nanopartículas funcionalizadas con un anticuerpo.<sup>65</sup>

## 3. CONCLUSIONES

En este capítulo se han preparado nanopartículas de dos formas, nanoesferas y nanoprismas, y cada una de ellas en diversos tamaños. Para la preparación de nanoesferas monodispersas de  $2,5 \pm 0,5$  y  $14 \pm 1$  nm se han utilizado las síntesis de Murray y Turkevich respectivamente. Posteriormente, en las nanoesferas estabilizadas por citrato este se ha sustituido por diversos PEG para aumentar la estabilidad. Se ha comprobado que la presencia de un fragmento alifático cercano al tiol aumenta la estabilidad coloidal de estas nanopartículas, probablemente al proporcionar un recubrimiento más denso. Por otro lado, se ha hecho una optimización del método de síntesis de los nanoprismas, que no requería el uso de ningún surfactante. Modificando una serie de parámetros como la cantidad de reductor y el número de adiciones, se han desarrollado métodos de síntesis para tres tamaños de NPrs.

Posteriormente, todos los tipos de nanopartículas se han funcionalizado con un intercalante de ADN mediante el acoplamiento por



carbodiimida. En el caso de las nanoesferas estabilizadas con PEG, la presencia de una parte alifática en el recubrimiento es crucial para mejorar la estabilidad del material y aumentar la cantidad de doxorubicina unida a cada nanopartícula. Los nanoclúster de oro presentan una mayor estabilidad que las nanoesferas después de la funcionalización con el intercalante. Asimismo, los NPRs presentaban un poco de agregación tras las funcionalizaciones con doxorubicina.

Finalmente, la estrategia de amplificación de la señal de SPR mediante la funcionalización de nanopartículas con doxorubicina no presentó buenos resultados, produciéndose amplificación de la señal únicamente cuando se utilizaban los NC-tiopronina-DOX. Este resultado pone de manifiesto la importancia de la presentación espacial de la molécula unida a la nanopartícula, que en este caso hace difícil la interacción de la DOX con el híbrido ADN:ARN. Por otro lado, los nanoclúster funcionalizados con intercalante presentan baja especificidad en la aplicación, ya que interaccionan con la sonda ADN aunque no se haya formado el complejo de doble hebra. Además, para las NS y NPRs, los resultados indican en algunos casos se puede producir una interacción entre el plasmón localizado de superficie de la NP y el plasmón de la superficie del sensor y que esta interacción es negativa para nuestra aplicación.

La hidrofobicidad de la DOX hace que probablemente no esté suficientemente expuesta para la interacción con el híbrido ADN/ARN por lo que no se produce una amplificación específica de la señal. Una alternativa es cambiar de estrategia para el reconocimiento del complejo de doble hebra. Para la ejecución del proyecto finalmente se empleó un anticuerpo monoclonal anti-híbrido ADN:ARN. El anticuerpo es naturalmente estable en disolución acuosa y además demasiado grande para quedar oculto por el recubrimiento de PEG, por lo que queda expuesto para interaccionar con el

## Capítulo 2

híbrido ADN:ARN. Esta estrategia tuvo éxito y los resultados se han publicado en un artículo científico y en la tesis doctoral del Dr. Álvaro Artiga.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Materiales y equipos**

El yoduro de potasio (KI), el ácido nítrico al 65%, el ácido clorhídrico al 37%, el ácido sulfúrico al 96%, metanol, etanolamina, ácido acético glacial, tris(hidroximetil)aminometano, cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) y el peróxido de hidrógeno al 33% se compraron de Panreac®.  $\text{HS-C}_2\text{H}_4\text{-CONH-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$  (MW = 5000 g/mol, HS-PEG-COOH) se adquirió de Rapp Polymere. El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) se adquirió de Alpha Aesar. El ácido tetracloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) se adquirió de Strem Chemicals. Hidróxido de sodio (NaOH), tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ), tetraborato de sodio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) sal de sodio de *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), clorohidrato de doxorubicina, clorohidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), cloruro de 2-amino-*N,N,N*-trimetiletan-1-amonio, dodecilsulfato de sodio (SDS) y citrato de sodio tribásico dihidratado se compraron a Sigma-Aldrich y se utilizaron como se recibieron. HS-PEG8-COOH, HS-FA-PEG12-COOH y HS-PEG7-OMe se adquirieron de Iris Biotech. Antes de su uso en la síntesis de nanopartículas de oro, toda la cristalería se lavó con agua regia (1:3 vol/vol ácido nítrico, 65%: ácido clorhídrico, 37%) y se enjuagó a fondo con agua Milli-Q de Millipore Q- Sistema POD®.

Los espectros UV-Vis-NIR se adquirieron usando un espectrofotómetro Cary 50 Probe® de Varian. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se registraron usando un SEM Inspect F50 de emisión de campo con un sistema EDX INCA PentaFETx3 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) en un rango de energía entre 0-30 keV. (FEI Europa, Eindhoven, Países Bajos) trabajando a 200 kV. Las imágenes de

## Capítulo 2

microscopía electrónica de transmisión (TEM) se recolectaron usando un FEI Tecnai T20 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) trabajando a 200 kV. Para preparar las muestras de TEM.

Para la determinación de los rendimientos de síntesis y purificación, se midió la concentración de oro mediante Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) utilizando un instrumento Horiba Yobin Activa (Horiba Scientific, Francia) en el Servicio Central de Análisis de Bizkaia (Leioa, España).

Las medidas de fluorescencia en el caso de la doxorrubicina se hicieron con un espectrómetro de fluorescencia, LS 55 (Perkin-Elmer, Reino Unido) equipado con una lámpara de xenón como fuente de excitación.

## 4.2 Síntesis de nanoesferas

### 4.2.1 Síntesis de los nanoclúster de 3 nm (NC-tiopronina)

En un matraz de 50 mL que contiene 20 mL de una mezcla MeOH:AcOEt (6:1), se añaden 150 mg de  $\text{HAuCl}_4$  (0,044 mmol) y 190 mg de tiopronina (0,12 nmol) y se agita la mezcla.

Posteriormente, se adicionan 30 mg de  $\text{NaBH}_4$  (0,793 mmol) en 7,5 mL de agua Milli-Q. Al añadir el reductor la mezcla se oscurece y se observa la formación de burbujas. La mezcla se deja agitando 30 min. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida a 40 °C.

El crudo se purifica por diálisis. Primero se disuelve en 20 mL de agua Milli-Q y se ajusta el pH a 1, añadiendo gota a gota una disolución de HCl 2 M. A continuación, se coloca la disolución resultante en una membrana de celulosa para diálisis (Sigma, MWCO 10.000) y la membrana se coloca en un vaso de precipitados de 5 L. El vaso se llena con agua Milli-Q hasta los 4

L. El agua del vaso de precipitados se cambiará tres veces al día durante tres días.

Tras la purificación, la disolución resultante se liofiliza y se obtienen 66,2 mg de NC-tiopronina.

#### **4.2.2 Síntesis de las nanoesferas (NS-cit)**

En un matraz de dos bocas de 500 mL, previamente lavado con agua regia y enjuagado con agua Milli-Q, envuelto en papel de aluminio, se añaden 11,7 mL de  $\text{HAuCl}_4$  20 mM (79,5 mg, 0,234 mmol) y se diluye en 183 mL agua Milli-Q. La disolución se calienta a ebullición con agitación. Posteriormente, se añade una disolución de 240 mg de citrato de sodio dihidratado (0,816 mmol) en 5 mL. Se deja agitando 30 min a 100 °C. Finalmente se deja enfriar a temperatura ambiente. Se obtiene de una disolución de color rojo.

#### **4.2.3 Estabilización de las nanoesferas de citrato con PEG (NS-PEG)**

En tubo Falcon de 50 mL (estéril, envuelto en papel de aluminio), se mezcla 10 nM de NS-Cit, 0.028% SDS, HS-PEG-COOH, NaOH hasta una concentración final de 25 mM en un volumen total de 50 mL. La mezcla se deja agitando durante 16 h. Luego de la incubación, se lava 3 veces con agua Milli-Q por centrifugación (Tabla 11). Al finalizar el último paso de centrifugación, el pellet de nanopartículas se resuspende en 5 mL de agua Milli-Q.

Tabla 11. Condiciones de centrifugación de las NS-PEG

## Capítulo 2

Ent.	PEG	Condiciones de centrifugación
1	PEG458/PEG-OMe	16000 g, 4 °C, 30 min
2	LA-PEG922	16000 g, 4 °C, 45 min
3	FA-PEG 818	16000 g, 4 °C, 40 min

### 4.3 Síntesis de los nanoprismas

#### 4.3.1 Método de síntesis de los P-NPrs

A una disolución de 200 mL de  $\text{HAuCl}_4$  2 mM (136 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ) se añaden 176 mL de una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (14 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) que contiene 20  $\mu\text{L}$  de KI 0,1 M (0,33 mg, 2  $\mu\text{mol}$ ). La adición de tiosulfato se hace de manera lenta, pero continua durante 30s. Tras 4 min, se añaden lentamente 176 mL de una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (14 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla resultante se deja reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Método de síntesis de los M-NPrs

A una disolución de 200 mL de  $\text{HAuCl}_4$  2 mM (136 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ) se añaden 140 mL de una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (11 mg, 70  $\mu\text{mol}$ ) que contiene 10  $\mu\text{L}$  de KI 0,1 M (0,16 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ). La adición de tiosulfato se hace de manera lenta, pero continua durante 30s. Tras 4 min, se añaden otros 140 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (11 mg, 70  $\mu\text{mol}$ ) que contiene 10  $\mu\text{L}$  de KI 0,1 M (0,16 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ). Se esperan otros 4 min y se añaden lentamente 60 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (4,7 mg, 30  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla resultante se deja reaccionar durante 1h a temperatura ambiente.

### **4.3.3 Método de síntesis de los G-NPrs**

A una disolución de 200 mL de  $\text{HAuCl}_4$  2 mM (136 mg, 400  $\mu\text{mol}$ ) se añaden 120 mL de una disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (9,2 mg, 60  $\mu\text{mol}$ ) que contiene 10  $\mu\text{L}$  de KI 0,1 M (0,16 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ). La adición de tiosulfato se hace de manera lenta, pero continua durante 30s. Tras 4 min, se añaden otros 120 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (9,2 mg, 60  $\mu\text{mol}$ ) que contienen 10  $\mu\text{L}$  de KI 0,1 M (0,16 mg, 1  $\mu\text{mol}$ ). Se esperan otros 4 min y se añaden lentamente 60 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,5 mM (4,7 mg, 30  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla resultante se deja reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente.

### **4.3.4 PEGilación de los P-NPrs, M-NPrs y G-NPrs con HS-PEG (5 kDa)-COOH**

Se añade una solución de HS-PEG-COOH (ac.) A NPrs con una relación PEG:nanoprismas de 2:1 (en mg). Después de eso, el pH se eleva a 12 con la adición de NaOH acuoso (2 M). Finalmente, la solución se sonica durante 1 hora a 60 °C para completar el recubrimiento con PEG. Los nanoprismas resultantes se centrifugan a 5500 rcf durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los reactivos sin reaccionar y los subproductos no deseados. Mientras se desecha el sobrenadante, el precipitado se resuspende en el mismo volumen de agua y se realizan dos etapas de lavado adicionales con agua Milli-Q usando las mismas condiciones.

## **4.4 Funcionalización de las nanopartículas con doxorubicina**

### **4.4.1 Funcionalización de las NS-PEG con doxorubicina**

## Capítulo 2

20 pmol de NS-PEG disuelta en agua se activaron con 40  $\mu\text{g}$  de EDC y 61  $\mu\text{g}$  de sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. Las NS-PEG activadas se incubaron con diferentes cantidades de doxorubicina durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 14  $\mu\text{g}$  de tris(hidroximetil)aminometano (120 nmol) para bloquear los grupos carboxílicos activados restantes durante otras 2 h a temperatura ambiente. Los NPs funcionales se centrifugaron 6 veces a 16000 g a 4 °C durante 30 min (PEG458 o 45 min para LA-PEG922 o FA-PEG818). Tras los primeros tres lavados las NPs se resuspendieron con una disolución de NaCl 10 mM + Tween 0,1% y los siguientes tres lavados con agua Milli-Q. Las nanopartículas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de volumen final.

### 4.4.2 Funcionalización de los NC-tiopronina con doxorubicina

0.2 mg de NC-tiopronina se activaron con 48  $\mu\text{g}$  EDC y 81  $\mu\text{g}$  sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. NC-tiopronina activadas se incubaron con diferentes cantidades de doxorubicina durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 68  $\mu\text{g}$  de etanolamina (700 nmol) o 122  $\mu\text{g}$  de cloruro de (2-aminoetil)trimetilamonio hidrocloreto (700 nmol) para bloquear los grupos carboxílicos activados que no hubieran reaccionado durante otras 2 h a temperatura ambiente. Los NC-tiopronina-DOX se centrifugaron 6 veces en Amicon de 10 kDa a 4000 g durante 10 min. Tras los primeros tres lavados las NPs se resuspendieron en 2 mL de una disolución de NaCl 1M + Tween 0,1% y tras los otros tres lavados, con agua Milli-Q. Las nanopartículas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de volumen final.

### 4.4.3 Funcionalización de los nanoprismas (NPrs-PEG-DOX)



0,5 mg de 1100NPrs-PEG o G-NPrs-PEG se activaron con 48  $\mu\text{g}$  de EDC y 81  $\mu\text{g}$  de sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. Los NPrs-PEG activados se incubaron con diferentes cantidades de doxorrubicina durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 14  $\mu\text{g}$  de tris(hidroximetil)aminometano (116 nmol) para bloquear los grupos carboxílicos activados restantes durante otras 2 h a temperatura ambiente; Los 1100NPrs-PEG-DOX se centrifugaron 3 veces a 2414 g durante 10 min. Los lavados de las nanopartículas son en agua. Finalmente, las nanopartículas se resuspenden en 500  $\mu\text{L}$  de volumen final.

### **4.5 Caracterización de los materiales**

#### **4.5.1 Preparación de disoluciones para espectroscopía de UV-vis-NIR, TEM y SEM**

Para preparar las muestras para los espectros de absorción UV-vis-NIR, la solución de NP (20  $\mu\text{L}$ , 1 mg mL<sup>-1</sup>) se mezcló con 980  $\mu\text{L}$  agua. Los espectros de absorción se registraron en una cubeta de cuarzo (0,2 cm  $\times$  1 cm, camino óptico = 0,2 cm).

Para preparar las muestras SEM, la solución de NPrs (3  $\mu\text{L}$ , 0,03 mg/mL) se depositó en una oblea de silicio y se dejó secar. La longitud del lado de los NPrs se midió usando el software ImageJ.

Para preparar las muestras de TEM, la solución de NPs (3  $\mu\text{L}$ , 0,03 mg/mL) se vertió en una gradilla de TEM y se dejó secar. El tamaño de partícula se midió usando el software ImageJ.

#### **4.5.2 Preparación de los geles de electroforesis**

Para los geles de electroforesis, NS-PEG mezcladas con disolución acuosa de glicerol (10  $\mu\text{L}$ , 1 pmol de NSs en glicerol 10%) se cargan en un

## Capítulo 2

gel de agarosa 1% que está inmerso en disolución de tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5% en una cubeta de electroforesis. La separación electroforética se realiza a 100 V durante 1h.

NC-tiopronina mezclados con disolución acuosa de glicerol (10  $\mu$ L, 10  $\mu$ g de NCs en glicerol 10%) se cargan en un gel de agarosa 4% que está inmerso en una cubeta de electroforesis llena de disolución TBE 0,5%. La separación electroforética se realiza a 90 V durante 30 min.

1100NPrs-PEG mezclados con disolución acuosa de glicerol (10  $\mu$ L, 10  $\mu$ g de NSs en glicerol 10%) se cargan en un gel de agarosa 0,7% que está inmerso en una cubeta de electroforesis llena de disolución TBE 0,5%. La separación electroforética se realiza a 120 V durante 1h.

### **4.5.3 Rendimiento de la síntesis de los nanoprismas por Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)**

Para la determinación de los rendimientos de síntesis de las nanopartículas, se midió la concentración de oro mediante ICP-Espectroscopía de emisión atómica (AES) Las muestras se transfirieron a viales Eppendorf para la digestión ácida. Para digerir las muestras, se trataron con 100  $\mu$ L de solución de piraña (3:1 vol/vol; ácido sulfúrico, 96%: peróxido de hidrógeno, 33%) durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de 300  $\mu$ L de agua regia (1:3 vol/vol; ácido nítrico, 65%: ácido clorhídrico, 37%) durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron a 60 °C durante 15 minutos y se diluyeron con agua Milli-Q a 20 mL. Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y evaluadas por ICP-AES (Espectroscopía de emisión atómica con Plasma Acoplado Inductivo utilizando un instrumento Horiba Yobin Activa (Horiba Scientific, Francia) en el Servicio Central de Análisis de Bizkaia (Leioa, España).

#### **4.5.4 Cuantificación de moléculas en el sobrenadante**

Para el ensayo de Ellman, se añaden 55  $\mu\text{L}$  de tampón Tris a pH 8, 218  $\mu\text{L}$  de muestra y 55  $\mu\text{L}$  DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)) en acetato de sodio 50 mM. Se deja reaccionar durante 5 min y se mide la absorbancia a 412 nm.

Para las medidas de fluorescencia de la doxorubicina, se seleccionó una apertura de la banda de absorción y de excitación de 7.5 nm, y una velocidad de barrido de 800 nm/min. La doxorubicina se excitó a 473 nm y se recogió la fluorescencia a 592 nm. Las muestras se colocaron en una cubeta Hellma 105.251-QS con un camino óptico de 3 x 3 mm y se analizaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra.

## **5. REFERENCIAS**

- (1) Naresh, V.; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Switzerland)* **2021**, *21* (4), 1–35. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- (2) Öndeş, B.; Akpınar, F.; Uygun, M.; Muti, M.; Aktaş Uygun, D. High Stability Potentiometric Urea Biosensor Based on Enzyme Attached Nanoparticles. *Microchem. J.* **2021**, *160* (October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105667>.
- (3) Riangrunroj, P.; Bever, C. S.; Hammock, B. D.; Polizzi, K. M. A Label-Free Optical Whole-Cell Escherichia Coli Biosensor for the Detection of Pyrethroid Insecticide Exposure. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48907-6>.
- (4) de Castro, A. C. H.; Alves, L. M.; Siquieroli, A. C. S.; Madurro, J. M.; Brito-Madurro, A. G. Label-Free Electrochemical Immunosensor for Detection of Oncomarker CA125 in Serum. *Microchem. J.* **2020**, *155* (December 2019), 104746. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104746>.
- (5) Kaur, H.; Shorie, M. Nanomaterial Based Aptasensors for Clinical and Environmental Diagnostic Applications. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (6), 2123–2138. <https://doi.org/10.1039/c9na00153k>.
- (6) Lowe, C. R. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. In *Handbook of Biosensors and Biochips*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2008**. <https://doi.org/10.1002/9780470061565.hbb003>.
- (7) Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8* (3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s8031400>.
- (8) Ramanathan, K.; Danielsson, B. Principles and Applications of Thermal Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (6), 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5).
- (9) Chen, C.; Wang, J. Optical Biosensors: An Exhaustive and Comprehensive Review. *Analyst* **2020**, *145* (5), 1605–1628. <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>.
- (10) Skládal, P. Piezoelectric Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.009>.
- (11) Liu, C.; Xue, N.; Cai, H.; Sun, J.; Qi, Z.; Zhao, P.; Xiong, F.; Geng, Z.;

- Jiang, L.; Li, L. Nanoparticles Enhanced Self-Driven Microfluidic Biosensor. *Micromachines* **2020**, *11* (4), 1–9. <https://doi.org/10.3390/MI11040350>.
- (12) Szunerits, S.; Spadavecchia, J.; Boukherroub, R. Surface Plasmon Resonance: Signal Amplification Using Colloidal Gold Nanoparticles for Enhanced Sensitivity. *Rev. Anal. Chem.* **2014**, *33* (3), 153–164. <https://doi.org/10.1515/revac-2014-0011>.
- (13) Šípová, H.; Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensing of Nucleic Acids: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *773*, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.040>.
- (14) Jebelli, A.; Oroojalian, F.; Fathi, F.; Mokhtarzadeh, A.; Guardia, M. de la. Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Biosensors for MicroRNAs Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *169* (August), 112599. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112599>.
- (15) Peng, Y.; Croce, C. M. The Role of MicroRNAs in Human Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2016**, *1* (November 2015). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.
- (16) Eacker, S. M.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Understanding MicroRNAs in Neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10* (12), 837–841. <https://doi.org/10.1038/nrn2726>.
- (17) Romaine, S. P. R.; Tomaszewski, M.; Condorelli, G.; Samani, N. J. MicroRNAs in Cardiovascular Disease: An Introduction for Clinicians. *Heart* **2015**, *101* (12), 921–928. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305402>.
- (18) Kappel, A.; Keller, A. MiRNA Assays in the Clinical Laboratory: Workflow, Detection Technologies and Automation Aspects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55* (5), 636–647. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0467>.
- (19) Uludag, Y.; Tothill, I. E. Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 5898–5904. <https://doi.org/10.1021/ac300278p>.
- (20) Kwon, M. J.; Lee, J.; Wark, A. W.; Lee, H. J. Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of Proteins at Attomolar Concentrations: Comparing Different Nanoparticle Shapes and Sizes. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1702–1707. <https://doi.org/10.1021/ac202957h>.
- (21) Lyon, L. A.; Peña, D. J.; Natan, M. J. Surface Plasmon Resonance of

## Capítulo 2

- Au Colloid-Modified Au Films: Particle Size Dependence. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (28), 5826–5831. <https://doi.org/10.1021/jp984739v>.
- (22) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. A. Intercalation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by DNA Duplex: Structural Features and Biological Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *66*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028>.
- (23) Castiello, F. R.; Tabrizian, M. Gold Nanoparticle Amplification Strategies for Multiplex SPRI-Based Immunosensing of Human Pancreatic Islet Hormones. *Analyst* **2019**, *144* (8), 2541–2549. <https://doi.org/10.1039/C9AN00140A>.
- (24) Browne, P.; Chandraratna, D.; Angood, C.; Tremlett, H.; Baker, C.; Taylor, B. V.; Thompson, A. J. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A Growing Global Problem with Widespread Inequity. *Neurology* **2014**, *83* (11), 1022–1024. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>.
- (25) Goldenberg, M. M. Multiple Sclerosis Review. *P T* **2012**, *37* (3), 175–184.
- (26) Thompson, A. J.; Baranzini, S. E.; Geurts, J.; Hemmer, B.; Ciccarelli, O. Multiple Sclerosis. *Lancet* **2018**, *391* (10130), 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- (27) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75.
- (28) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- (29) Hendel, T.; Wuthschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J. In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with Uv-Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11115–11124. <https://doi.org/10.1021/ac502053s>.
- (30) Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (21), 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02123>.

- (31) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2007**, *58* (1), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>.
- (32) Maus, L.; Dick, O.; Bading, H.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R. Conjugation of Peptides to the Passivation Shell of Gold Nanoparticles for Targeting of Cell-Surface Receptors. *ACS Nano* **2010**, *4* (11), 6617–6628. <https://doi.org/10.1021/nn101867w>.
- (33) Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Tortiglione, C.; De La Fuente, J. M. Design of Multifunctional Gold Nanoparticles for in Vitro and in Vivo Gene Silencing. *ACS Nano* **2012**, *6* (9), 8316–8324. <https://doi.org/10.1021/nn3030223>.
- (34) Hill, H. D.; Mirkin, C. A. The Bio-Barcode Assay for the Detection of Protein and Nucleic Acid Targets Using DTT-Induced Ligand Exchange. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 324–336. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.51>.
- (35) Kim, B. H.; Hackett, M. J.; Park, J.; Hyeon, T. Synthesis, Characterization, and Application of Ultrasmall Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 59–71. <https://doi.org/10.1021/cm402225z>.
- (36) Sonia; Komal; Kukreti, S.; Kaushik, M. Gold Nanoclusters: An Ultrasmall Platform for Multifaceted Applications. *Talanta* **2021**, *234* (March), 122623. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122623>.
- (37) Templeton, A. C.; Chen, S.; Gross, S. M.; Murray, R. W. Water-Soluble, Isolable Gold Clusters Protected by Tiopronin and Coenzyme a Monolayers. *Langmuir* **1999**, *15* (1), 66–76. <https://doi.org/10.1021/la9808420>.
- (38) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 Nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 17–30. <https://doi.org/10.1021/la970588w>.
- (39) Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. *Small* **2009**, *5* (6), 646–664. <https://doi.org/10.1002/sml.200801480>.
- (40) Riley, R. S.; Day, E. S. Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer

## Capítulo 2

- Treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, 9 (4). <https://doi.org/10.1002/wnan.1449>.
- (41) Bryce, J. F.; Tsigara, A.; Bélier, B.; De La Chapelle, M. L.; Canva, M.; Bartenlian, B.; Barbillon, G. Surface Enhanced Raman Scattering Improvement of Gold Triangular Nanoprisms by a Gold Reflective Underlayer for Chemical Sensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, 228, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.018>.
- (42) Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Gold Nanoprism–Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation Capacity. *Nanomedicine* **2016**, 11 (22), 2903–2916. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0257>.
- (43) Moros, M.; Lewinska, A.; Merola, F.; Ferraro, P.; Wnuk, M.; Tino, A.; Tortiglione, C. Gold Nanorods and Nanoprisms Mediate Different Photothermal Cell Death Mechanisms in Vitro and in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (12), 13718–13730. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c02022>.
- (44) Huergo, M. A.; Giovanetti, L.; Moreno, M. S.; Maier, C. M.; Requejo, F. G.; Salvarezza, R. C.; Vericat, C. New Insight into the Chemical Nature of the Plasmonic Nanostructures Synthesized by the Reduction of Au(III) with Sulfide Species. *Langmuir* **2017**, 33 (27), 6785–6793. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01168>.
- (45) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, 28 (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (46) Saverot, S.-E. E.; Reese, L. M.; Cimini, D.; Vikesland, P. J.; Bickford, L. R. Characterization of Conventional One-Step Sodium Thiosulfate Facilitated Gold Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, 10 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0940-1>.
- (47) Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. A. Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation. *Langmuir* **2009**, 25 (16), 9518–9524. <https://doi.org/10.1021/la900757s>.
- (48) Ha, T. H.; Koo, H. J.; Chung, B. H. Shape-Controlled Syntheses of Gold Nanoprisms and Nanorods Influenced by Specific Adsorption of Halide Ions. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111 (3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/jp066454l>.
- (49) D’Arpa, P.; Liu, L. F. Topoisomerase-Targeting Antitumor Drugs. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1989**, 989 (2), 163–177.



[https://doi.org/10.1016/0304-419X\(89\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0304-419X(89)90041-3).

- (50) Saha, B.; Songe, P.; Evers, T. H.; Prins, M. W. J. The Influence of Covalent Immobilization Conditions on Antibody Accessibility on Nanoparticles. *Analyst* **2017**, *142* (22), 4247–4256. <https://doi.org/10.1039/c7an01424d>.
- (51) Gilles, M. A.; Hudson, A. Q.; Borders, C. L. Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution. *Anal. Biochem.* **1990**, *184* (2), 244–248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90675-Y](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90675-Y).
- (52) Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. *Anal. Biochem.* **1986**, *156* (1), 220–222. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90176-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90176-4).
- (53) Sanz, V.; Conde, J.; Hernández, Y.; Baptista, P. V.; Ibarra, M. R.; De La Fuente, J. M. Effect of PEG Biofunctional Spacers and TAT Peptide on DsRNA Loading on Gold Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14* (6). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0917-2>.
- (54) Conde, J.; Tian, F.; Hernández, Y.; Bao, C.; Cui, D.; Janssen, K. P.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Stoeger, T.; de la Fuente, J. M. In vivo Tumor Targeting via Nanoparticle-Mediated Therapeutic siRNA Coupled to Inflammatory Response in Lung Cancer Mouse Models. *Biomaterials* **2013**, *34* (31), 7744–7753. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.041>.
- (55) Cammarata, C. R.; Hughes, M. E.; Ofner, C. M. Carbodiimide Induced Cross-Linking, Ligand Addition, and Degradation in Gelatin. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (3), 783–793. <https://doi.org/10.1021/mp5006118>.
- (56) Barbir, R.; Jiménez, R. R.; Martín-Rapún, R.; Strasser, V.; Domazet Jurašin, D.; Dabelić, S.; de la Fuente, J. M.; Vinković Vrček, I. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (23), acsami.1c04063. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04063>.
- (57) De La Fuente, J. M.; Berry, C. C.; Riehle, M. O.; Adam, S.; Curtis, G. Nanoparticle Targeting at Cells. *Langmuir* **2006**, *22* (7), 3286–3293. <https://doi.org/10.1021/la053029v>.
- (58) Tawagi, E.; Massmann, C.; Chibli, H.; Nadeau, J. L. Differential Toxicity of Gold-Doxorubicin in Cancer Cells vs. Cardiomyocytes as Measured by Real-Time Growth Assays and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *Analyst* **2015**, *140* (16), 5732–5741.

## Capítulo 2

<https://doi.org/10.1039/c5an00446b>.

- (59) Boselli, L.; Polo, E.; Castagnola, V.; Dawson, K. A. Regimes of Biomolecular Ultrasmall Nanoparticle Interactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (15), 4215–4218. <https://doi.org/10.1002/anie.201700343>.
- (60) Tapia-Arellano, A.; Gallardo-Toledo, E.; Ortiz, C.; Henríquez, J.; Feijóo, C. G.; Araya, E.; Sierpe, R.; Kogan, M. J. Functionalization with PEG/Angiopep-2 Peptide to Improve the Delivery of Gold Nanoprismes to Central Nervous System: In Vitro and in Vivo Studies. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *121* (December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111785>.
- (61) Brann, T.; Patel, D.; Chauhan, R.; James, K. T.; Bates, P. J.; Malik, M. T.; Keynton, R. S.; O'Toole, M. G. Gold Nanoplates as Cancer-Targeted Photothermal Actuators for Drug Delivery and Triggered Release. *J. Nanomater.* **2016**, *2016*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/2036029>.
- (62) Gao, Y.; Han, D.; Feng, J. MicroRNA in Multiple Sclerosis. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *516* (December 2020), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.020>.
- (63) Keller, A.; Leidinger, P.; Lange, J.; Borries, A.; Schroers, H.; Scheffler, M.; Lenhof, H.-P.; Ruprecht, K.; Meese, E. Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. *PLoS One* **2009**, *4* (10), e7440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007440>.
- (64) Artiga-Folch, Á. Gold Nanoparticles and Chitosan Encapsulation for Therapy and Sensing, 2020.
- (65) Sguassero, A.; Artiga, Á.; Morasso, C.; Jimenez, R. R.; Rapún, R. M.; Mancuso, R.; Agostini, S.; Hernis, A.; Abols, A.; Linē, A.; Gualerzi, A.; Picciolini, S.; Bedoni, M.; Rovaris, M.; Gramatica, F.; de la Fuente, J. M.; Vanna, R. A Simple and Universal Enzyme-Free Approach for the Detection of Multiple MicroRNAs Using a Single Nanostructured Enhancer of Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (9), 1873–1885. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1331-0>.

# **Capítulo 3**

## **Evaluación de nano-bio- interacciones de nanopartículas recubiertas con doxorubicina**

## Capítulo 3

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la mayoría de los fármacos utilizados para medicina son moléculas orgánicas pequeñas. Frecuentemente, estas moléculas muestran una baja solubilidad en disolución acuosa y un transporte deficiente a la diana terapéutica, que son las causas de más del 40 % de fracasos en el desarrollo de fármacos.<sup>1</sup> El desarrollo de métodos efectivos de transporte y liberación de fármacos permitiría utilizar moléculas que son activas en la diana terapéutica pero que no pueden alcanzarla *in vivo*.

Diferentes tipos de quimioterapia están aprobados para tratamiento del cáncer. Sin embargo, los efectos secundarios de estos fármacos son muy perjudiciales para la salud y pueden llevar a la muerte debido a cambios fisiológicos en el tejido sano. Además, el impacto psicológico que producen los síntomas de los efectos secundarios es notorio. Asimismo, la administración directa de fármacos anticancerígenos se encuentra limitada por una rápida eliminación del fármaco, citotoxicidad no específica, baja biodisponibilidad y la existencia de tumores resistentes a múltiples fármacos.<sup>1</sup> Para resolver estas limitaciones, se han diseñado transportadores de fármacos en la nanoescala que incluyen nanopartículas metálicas, liposomas, materiales cerámicos, y micelas poliméricas.<sup>1</sup> Los sistemas de transporte de fármacos no solo sirven para proteger principios activos sensibles a la degradación o para solubilizarlos en el medio biológico. Además, pueden mejorar su eficacia al aumentar su biodisponibilidad, prolongando su tiempo de circulación y posibilitando su direccionamiento hacia el tejido diana.<sup>3</sup> En esta tesitura, los sistemas están diseñados para el control de la liberación y la absorción del fármaco en una parte específica del cuerpo.<sup>2,4</sup> Asimismo, se reducen más los efectos secundarios del fármaco y se maximiza su eficacia al aumentar la concentración efectiva de fármaco en el tejido o célula diana durante un periodo de tiempo específico. Las

### Capítulo 3

nanopartículas se han desarrollado como transportadores de diversos tipos de moléculas como factores de crecimiento, genes, agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios o anticuerpos.<sup>5,6</sup> Para el direccionamiento a la diana terapéutica se han utilizado dos estrategias principales:<sup>7</sup> el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo.

Por un lado, en el direccionamiento activo, las nanopartículas se funcionalizan con biomoléculas capaces de interaccionar con receptores biológicos específicos de un tejido o tipo celular, tales como anticuerpos, moléculas pequeñas o péptidos.<sup>8</sup> Los péptidos participan en muchos mecanismos fisiológicos importantes y controlan casi todas las funciones vitales en humanos incluyendo sistema inmune, digestión, metabolismo, reproducción, respiración, y sensibilidad al dolor.<sup>9</sup> El direccionamiento activo se abordará en detalle en el Capítulo 5.

Por otro lado, en el direccionamiento pasivo el tamaño de las nanopartículas hace que se acumulen preferentemente en un tejido o en una célula. En el caso de los tumores, se ha descrito que su fisiología y estructura anormal los hacen más permeables a las nanopartículas que los tejidos sanos debido al tamaño de estas. Además, las nanopartículas quedarían retenidas en los tumores también debido a su tamaño. Este fenómeno se ha denominado permeabilidad y retención aumentada (EPR). Como consecuencia del EPR en el tumor, los efectos secundarios serían menores ya que los tejidos sanos estarían menos expuestos al fármaco.

Asimismo, el recubrimiento de la nanopartícula se puede utilizar para evitar o posponer la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (SFM).<sup>\*</sup> Así, se puede prolongar el tiempo de circulación de la nanopartícula y, en principio, aumentar la probabilidad de que se produzca el

---

<sup>\*</sup>El sistema fagocítico mononuclear se encuentra integrado por células de todo el organismo, y su misión principal es destruir por fagocitosis partículas extrañas, microorganismos, toxinas, etc.

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

direccionamiento pasivo por EPR.<sup>10</sup> Esta estrategia también depende de propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como el tamaño, la carga y la superficie.<sup>11,12</sup> El tamaño y la forma tienen una gran influencia en la captación celular. El grupo de Chitharani investigó la internalización de nanoesferas (NSs) de oro de 14, 50 y 74 nm en células Hela. Las nanopartículas de 50 nm presentaron mayor eficiencia en la internalización por esta línea celular.<sup>13</sup> Este grupo observó que las nanoesferas se internalizaban 500 veces más que los nanobastones, debido a que la deformación en la membrana es mayor para nanopartículas con una alta relación de aspecto.

Además de asegurarnos de que la nanopartícula llegue hasta la diana de interés, es importante entender la interacción entre las nanopartículas y las proteínas y así controlar los posibles efectos secundarios que se generen.<sup>4</sup> La interacción de las nanopartículas con los componentes biológicos genera un recubrimiento de proteínas alrededor de la superficie de la nanopartícula, también conocido como corona de proteínas. La capa de proteína absorbida en la superficie de la NP modifica sus propiedades *in vivo*. El proceso de la formación de la corona de proteína es complicado e implica procesos cinéticos y dinámicos. Con respecto a la formación de la corona de proteínas, los cambios estructurales de la proteína en la NP deberían ser estudiados para incrementar la disponibilidad de nanopartículas *in vivo*. En la bibliografía se encuentran patologías médicas como la enfermedad del Alzheimer, enfermedad del Parkinson y diabetes tipo 2, que se deben a los cambios en la estructura de proteínas y a la formación de amiloides.<sup>4</sup>

En este capítulo se plantea usar las nanoesferas de 14 nm como nanotransportadores de fármacos. Se elige de fármaco modelo la doxorrubicina, para la que ya habíamos optimizado la funcionalización de nanopartículas de oro en el Capítulo 2. La doxorrubicina es un conocido

### Capítulo 3

agente quimioterapéutico con actividad alta contra un amplio espectro de tipos de cáncer. Este fármaco está considerado uno de los agentes quimioterapéuticos aprobados más potentes.<sup>14</sup> El fármaco actúa intercalándose entre los pares de base del ADN, lo que produce una serie de efectos citotóxicos que resultan en la apoptosis de las células cancerígenas.<sup>15</sup> Sin embargo, la concentración efectiva de doxorubicina tiene que ser controlada porque genera algunos efectos secundarios como cardiopatía, que puede desencadenar un fallo del corazón. Esto limita la dosis acumulada que se puede administrar.<sup>16</sup> En la bibliografía se encuentran multitud de ejemplos de transporte de fármacos anticancerígenos empleando nanopartículas de oro.<sup>17,18</sup> Una de las estrategias más utilizadas es la liberación de doxorubicina por ruptura de un enlace lábil, como en hidrazonas<sup>19</sup> o en disulfuros.<sup>20</sup> La preferencia por la ruptura de enlace en medio ácido se basa en que el microambiente tumoral tiene un pH menor que los tejidos sanos. Otras estrategias han utilizado las nanopartículas de tiopronina de 3 nm funcionalizadas con doxorubicina mediante un enlace amida.<sup>21</sup> Una vez la nanopartícula está dentro de la célula, podría liberarse la DOX por ruptura del enlace amida o enlace Au-S. Sin embargo, esta estrategia no es efectiva cuando se aplica en modelos animales, ya que su reducido tamaño (< 10 nm) facilita su rápida eliminación por el riñón.<sup>22</sup>

En nuestro caso, el sistema de doxorubicina unida a las nanopartículas podría funcionar como sistema de liberación de fármaco debido a la alta concentración de glutatión (GSH) en el citoplasma, cuya concentración en células de mamífero está en el rango milimolar.<sup>23</sup> Se utilizarán diversas técnicas para el estudio de la toxicidad celular y para la caracterización de la interacción de las nanopartículas con biomoléculas y para el estudio de la toxicidad.



## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Caracterización de las nanopartículas

La funcionalización con doxorrubicina realizada en el Capítulo 2 mostraba la importancia que tiene la cadena alifática junto al grupo tiol para que las nanopartículas sean estables con una densidad de doxorrubicina más alta. Asimismo, al utilizar un polímero corto, PEG458, solo se podía funcionalizar con una baja cantidad de doxorrubicina y la estabilidad de las nanopartículas se veía drásticamente afectada. Así que en este capítulo se propone el uso de polímeros de mayor tamaño que podrían mejorar la estabilidad de la nanopartícula por medio del impedimento estérico tras la conjugación con la DOX. Por lo tanto, se usarán dos polímeros PEG largos, de 3kDa. Uno será un monotiol, PEG3kDa, y el otro tendrá un fragmento alifático unido a un grupo 1,3-ditiol (LA-PEG3kDa) (Figura 1).

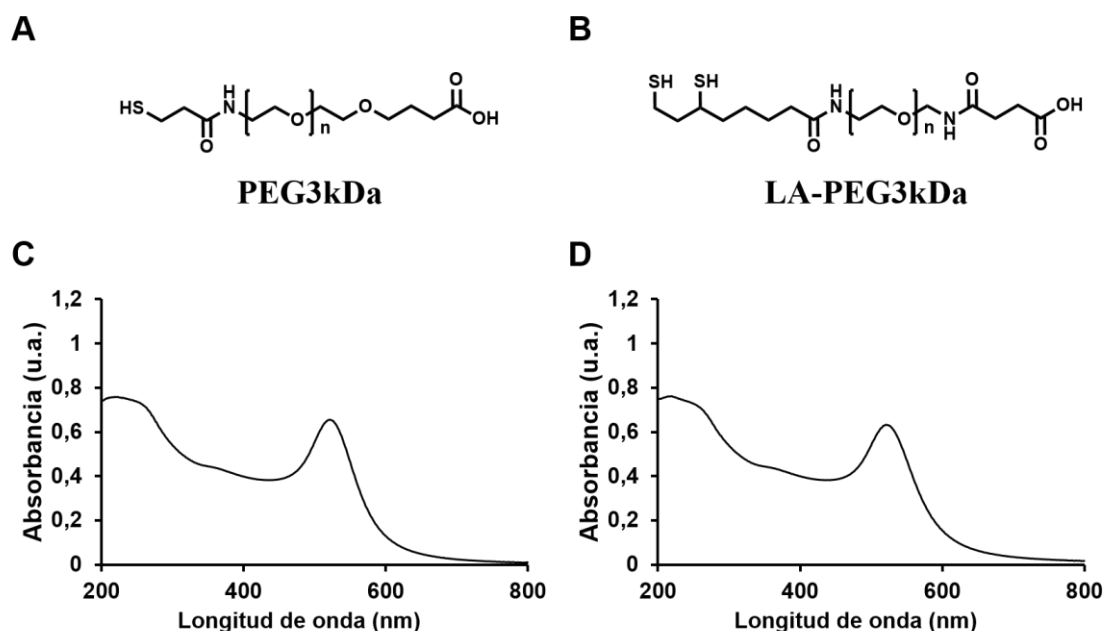


Figura 1. Estructura de los polímeros estabilizantes: PEG3kDa (A) y LA-PEG3kDa (B). Espectro UV-vis de las NS-PEG3kDa (C) y NS-LA-PEG3kDa (D) tras el intercambio de ligando de las NS-Cit.

### Capítulo 3

Para el recubrimiento de las NS-Cit con PEG3kDa y LA-PEG3kDa, se utiliza el mismo procedimiento que para LA-PEG922 (véase Capítulo 2), es decir, se utilizan alrededor de 4000 cadenas de polímero por nanopartícula. Tras el intercambio de ligando se produce un leve desplazamiento de la longitud de onda del plasmón de 519 a 522 nm (Figura 1, C-D) tal como se observó para otros polímeros en el Capítulo 2.

NS-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa se funcionalizan mediante la activación con EDC y sulfo-NHS, y el material resultante se caracteriza por espectroscopía UV-vis y electroforesis en gel de agarosa. Inicialmente, se funcionaliza NS-PEG3kDa con doxorrubicina a diferentes concentraciones (6,5, 13, 20, 26  $\mu\text{g}$  DOX/mg NS) a pH 6. A este pH la funcionalización ocurre con un bajo rendimiento ( $< 15\%$ ) ya que únicamente se puede unir 118 DOX/NPs (3,84  $\mu\text{g}$  DOX/mg NPs) (Figura 2). Cuando se realiza la funcionalización con las NS-LA-PEG3kDa se elige un pH básico (pH 8) debido a resultados previos del capítulo 2. En este caso el rendimiento de la reacción aumenta hasta 400 DOX/NP (13  $\mu\text{g}$  DOX/mg NPs).

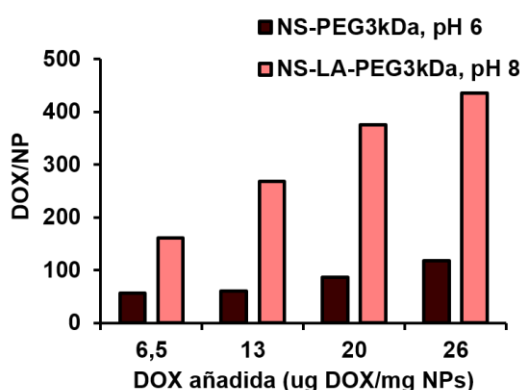


Figura 2. Cantidad de doxorrubicina unida por nanopartícula (DOX/NP) en la funcionalización de NS-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa.

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

Al hacer la funcionalización de las NS-PEG3kDa a pH 8 la estabilidad de las nanopartículas se ve afectada a medida que aumenta la cantidad de doxorubicina añadida (Figura 3, A). Se observa que a medida que aumenta la concentración de doxorubicina, el coeficiente de estabilidad<sup>†</sup> disminuye. Asimismo, cuando las nanopartículas recorren el gel se produce agregación en la mayor concentración de DOX utilizada (Figura 3, C). Con respecto a las NS-LA-PEG3kDa, el aumento de concentración de doxorubicina no produce agregación de la nanopartícula ni en el gel de electroforesis ni UV-vis (Figura 3, B y D). Para el estudio posterior, únicamente continuamos con las NS-LA-PEG3kDa-DOX y las compararemos con las nanopartículas sin funcionalizar (NS-LA-PEG3kDa).

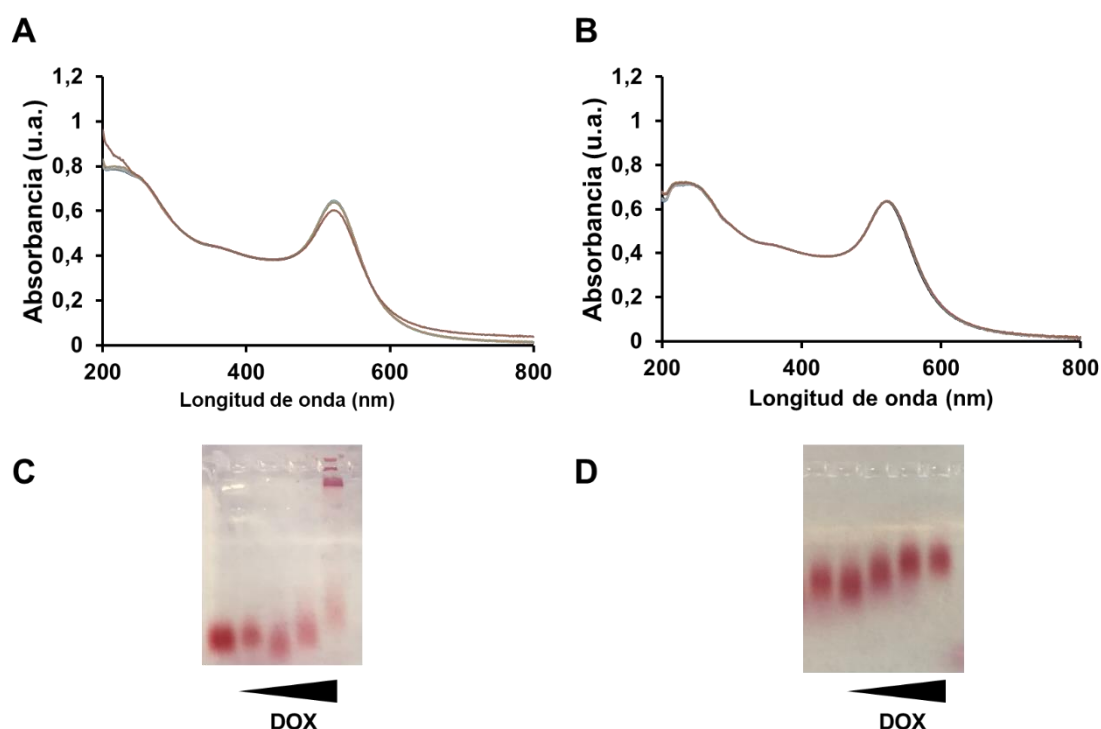


Figura 3. Espectro UV-vis (A, B) y gel de electroforesis (C, D) de las NS-PEG3kDa-DOX y NS-LA-PEG3kDa-DOX que se han funcionalizado a pH 8.

<sup>†</sup> Coeficiente de estabilidad es la relación de la absorbancia en el máximo del plasmón de superficie y la absorbancia a 600 nm, que dan información del estado de dispersión de la muestra

### Capítulo 3

Antes de aplicar las nanopartículas es necesario evaluar su estabilidad coloidal en medios de relevancia biológica. Se determina la estabilidad de NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX mediante el estudio de los cambios de tamaño del diámetro hidrodinámico, y potencial  $\zeta$  de las nanopartículas. Las nanopartículas se incuban en agua mili-Q y medio de cultivo celular para experimentos en células, DMEM, sin y con la adición de suero fetal de bovino (DMEM o DMEM+FBS) a 37 °C (Figura 4). Tanto el DLS como el potencial  $\zeta$  se miden a cuatro tiempos diferentes 0, 1, 4, y 24 h. Es de esperar que la presencia de suero en el medio de cultivo produzca la formación de la corona de proteínas y en consecuencia puedan cambiar los valores de potencial  $\zeta$  o diámetro hidrodinámico.

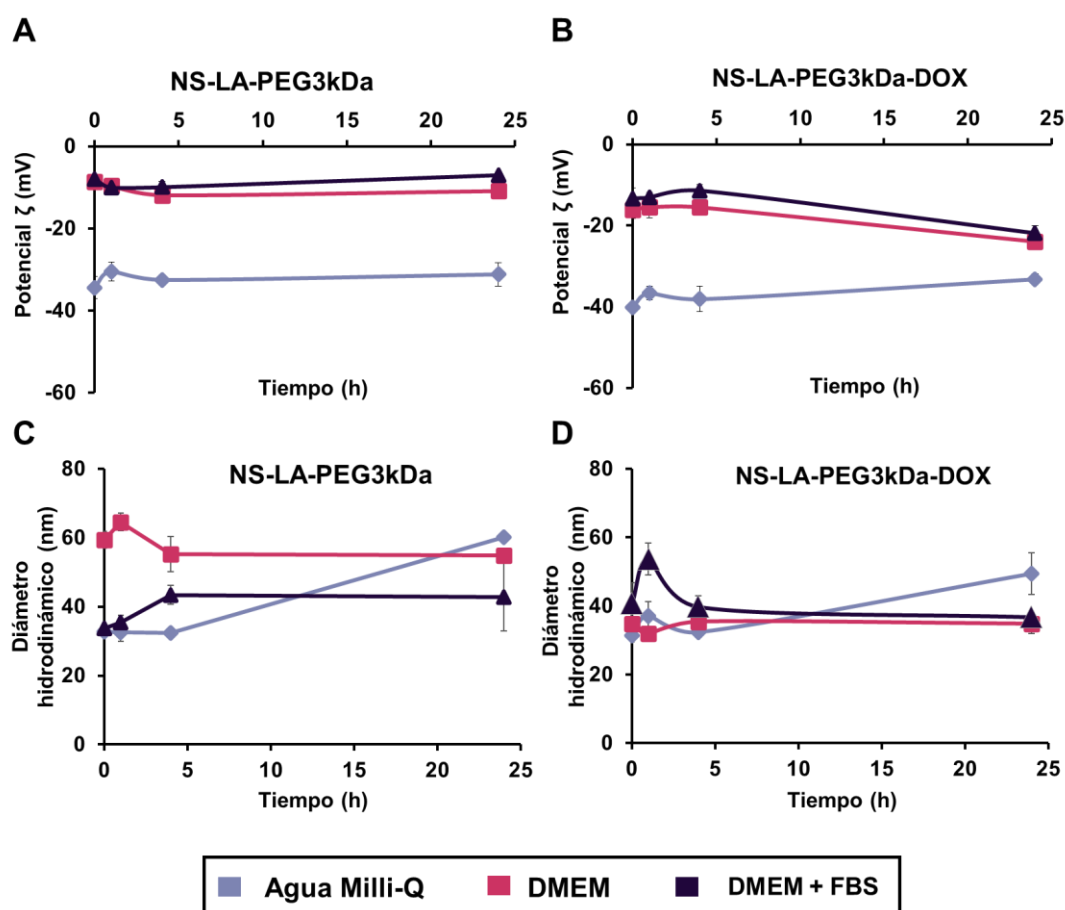


Figura 4. Potencial  $\zeta$  y DLS de NS-LA-PEG3kDa (A y C) y de NS-LA-PEG3kDa-DOX (B y D) en agua Milli-Q, medio de cultivo (DMEM) o medio de cultivo con suero (DMEM+FBS). Las nanopartículas se incubaron a una concentración de 0,6 nM durante 0, 1, 4 y 24 h. Todos los experimentos se realizaron a 37 °C.

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

Con respecto al potencial  $\zeta$  (Figura 4, A-B), se observa que el potencial  $\zeta$  de las nanopartículas en agua no se modifica, manteniéndose a lo largo del tiempo en ambos materiales alrededor de -38 mV. Cuando las nanopartículas se incuban en DMEM se produce una disminución del valor absoluto del potencial  $\zeta$  queda en torno a -12 mV. Esto es debido a los diferentes componentes que presenta el medio de cultivo. El cambio en el potencial  $\zeta$  es mayor para las NS-LA-PEG3kDa-DOX, probablemente porque se produce una mayor interacción de estas nanopartículas con moléculas en el medio. Con respecto al diámetro hidrodinámico (Figura 4, C-D), la estabilidad de las nanopartículas disminuye en agua, aumentando el radio hidrodinámico de 30 hasta 50 nm. En cambio, se mantiene constante en presencia de medio tanto con suero como sin suero. Esto puede deberse a la formación de la corona de proteínas, que mantiene un diámetro hidrodinámico estable a las 24 h mientras las nanopartículas se mantienen más estables.

### 2.2 Interacción de la BSA con las nanopartículas

Anteriormente habíamos nombrado la importancia de la formación de la corona de proteínas en la superficie de los nanomateriales. La interacción de las nanopartículas con las proteínas del suero es un aspecto importante en el caso de aplicaciones *in vivo* de nanopartículas funcionalizadas.<sup>24</sup> La interacción de las nanopartículas con proteínas puede afectar a la conformación de las proteínas debido a la formación de nuevas interacciones intermoleculares secundarias como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.<sup>25</sup> Estos cambios en la conformación de las proteínas pueden llegar a ser irreversibles produciendo su desnaturalización, lo que puede provocar una respuesta del sistema inmune y en consecuencia afectar a la toxicidad y direccionamiento

### Capítulo 3

de la NP.<sup>24,26</sup> La estructura secundaria de las proteínas se puede estudiar mediante espectroscopía de dicroísmo circular.<sup>24</sup>

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) mide la absorción diferencial de luz polarizada circularmente a izquierda y a derecha, normalmente en el espectro UV-Vis. Se ha demostrado que diferentes tipos de estructuras secundarias de las proteínas — hélice  $\alpha$  y láminas  $\beta$  paralelas y anti-paralelas, giros y otros — producen distintas bandas en el rango entre 180 y 260 nm del espectro CD, lo que permite analizar la estructura secundaria de las proteínas.<sup>27</sup>

Para estudiar el efecto que la interacción con las nanopartículas puede producir sobre la estructura de las proteínas se ha seleccionado como modelo la albúmina de suero bovino (BSA). Se trata de la proteína más abundante en la sangre bovina de forma análoga a la albúmina de suero humano en la sangre humana. La BSA está compuesta de una única cadena polipeptídica que está formada por 583 aminoácidos y 17 enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro son básicos para que la molécula de BSA sea bastante compacta, así como para dar estabilidad a la estructura helicoidal.<sup>28</sup>

Primero se examina la conformación nativa de la proteína (Figura 5). La forma y posición de las bandas reflejan que la hélice alfa es la estructura predominante en la BSA. Así, se registra una banda de absorción intensa debido a la transición  $p-p^*$  en el enlace peptídico y la banda menos intensa con elipticidad negativa a 222 nm causada por las transiciones  $n-\pi^*$  de la cadena peptídica.<sup>29</sup> Sin embargo, la contribución de otras estructuras puede modificar la posición y las intensidades relativas de las bandas características. Estos parámetros se pueden utilizar para evaluar los tipos de estructura secundaria presentes en la proteína mediante el *software* instalado en el espectropolarímetro de dicroísmo circular. Para la BSA se obtiene un

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

64,6% de contenido de hélice  $\alpha$  que coincide con los datos de la bibliografía.<sup>30,31</sup>

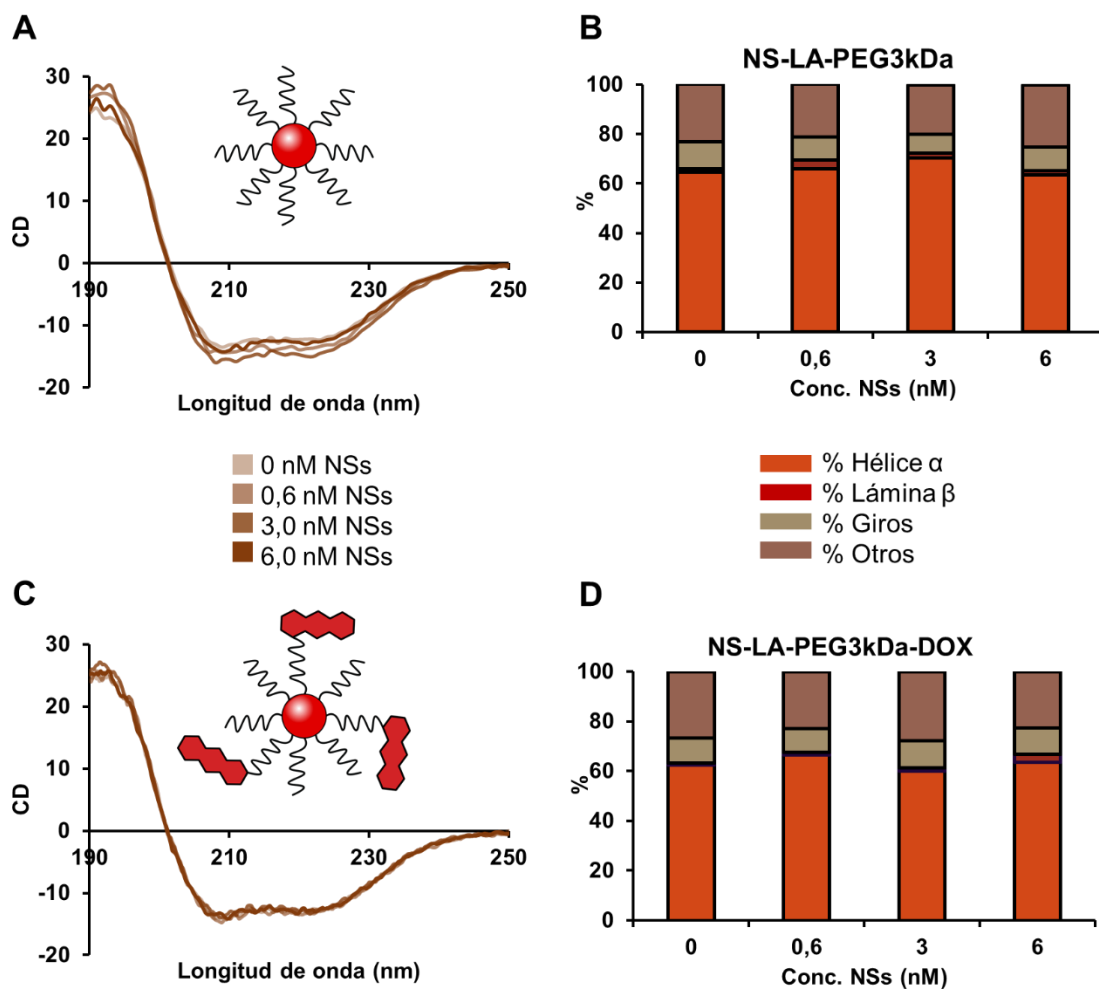


Figura 5. Espectros de dicroísmo circular de la BSA en ausencia y presencia de NS-LA-PEG3kDa (A) y NS-LA-PEG3kDa-DOX (C) a concentraciones de NPs de 0,6, 3 y 6 nM. Porcentaje de contenido de hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$ , giros y componentes estructurales aleatorios de la BSA debido a las interacciones con las nanopartículas a diferentes concentraciones para las NS-LA-PEG3kDa (B) y NS-LA-PEG3kDa-DOX (D).

Se ha descrito que los cambios conformacionales que producen las NPs en la estructura secundaria de las proteínas dependen de la concentración de las NPs.<sup>28</sup> Por lo tanto, la BSA se incubó con diferentes concentraciones de NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX. La

### Capítulo 3

interacción de la BSA con las nanopartículas no produce un cambio significativo en la contribución de la hélice  $\alpha$  que sigue siendo la estructura más abundante (Figura 5 B y D). Sin embargo, produce cambios en las contribuciones de otras conformaciones. No se observa una tendencia de estos cambios respecto a la concentración de nanopartículas por lo que pueden deberse a la variabilidad experimental. En la bibliografía, los análisis espectroscópicos de BSA-NS-PEG muestran que tampoco se produce un cambio estructural fuerte y que se retiene la mayor parte de la estructura tras la formación del conjugado.<sup>28</sup>

Además de los cambios de conformación en la proteína, se puede evaluar la constante de asociación de la proteína con las nanopartículas y de esta manera evaluar si hay un efecto de la DOX unida a la nanopartícula. Dicha constante se puede obtener mediante la espectroscopía de fluorescencia. Las proteínas que contienen uno o varios aminoácidos con residuos aromáticos— triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) — presentan fluorescencia.<sup>32</sup> En presencia de Trp o Tyr la contribución de la fenilalanina se suele considerar despreciable por su baja absorción y rendimiento cuántico. Aunque la tirosina tiene un rendimiento cuántico similar al triptófano, su absorción es menor por lo que, si está presente, el grupo indol del triptófano se suele considerar la fuente dominante de la absorbancia en el UV a 280 y de la emisión a 350 nm.<sup>33</sup> El estudio de la constante de asociación mediante espectroscopía de fluorescencia se basa en la desactivación (*quenching*) de la fluorescencia del triptófano producida por cambios en su entorno o por la proximidad de las nanopartículas.

Existen dos mecanismos principales de desactivación, dinámico o estático, que se producen respectivamente por colisiones y por la formación de un complejo en el estado fundamental entre el fluoróforo y el desactivante. La desactivación estática se puede distinguir fácilmente de la



## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

dinámica a través de la dependencia de la temperatura o las medidas de tiempo de vida de emisión. Si la desactivación es dinámica la constante de desactivación bimolecular, que depende de la difusión, aumenta con la temperatura. Sin embargo, en la desactivación estática la constante disminuye con el aumento de temperatura porque la estabilidad del complejo entre el fluoróforo y el desactivante disminuye al aumentar la temperatura. Asimismo, si el aumento de la concentración del desactivante no tiene efecto en el tiempo de vida de la fluorescencia de la BSA, entonces la desactivación sigue un mecanismo estático. Sin embargo, en la desactivación dinámica el tiempo de vida de la fluorescencia disminuye con el aumento en la concentración del desactivante. En el caso de las nanopartículas de oro se ha demostrado que la adición de nanopartículas de oro no tiene ningún efecto en el tiempo de vida de la fluorescencia de la BSA.<sup>34</sup>

Los datos de fluorescencia se analizan mediante la ecuación de Stern-Volmer para identificar el tipo de desactivación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

donde  $F_0$  y  $F$  representan la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivante,  $k_q$  es la constante bimolecular de desactivación,  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer,  $\tau_0$  es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora (para la BSA es  $5 \cdot 10^{-9}$  s)<sup>35</sup> y  $[Q]$  es la concentración del desactivante. Por lo tanto, se mide el espectro de emisión de fluorescencia para la BSA y para mezclas de BSA con concentraciones crecientes de nanopartículas. En la Figura 6 A-B, se observa que el aumento de la concentración de las nanopartículas no produce un desplazamiento en el máximo de fluorescencia, lo que indica que la interacción de las nanopartículas de oro con el fluoróforo no modifica el microambiente en torno al fluoróforo. Se ha demostrado que las nanopartículas de plata

### Capítulo 3

producen una disminución de la longitud de onda del máximo de emisión de la BSA.<sup>36</sup>

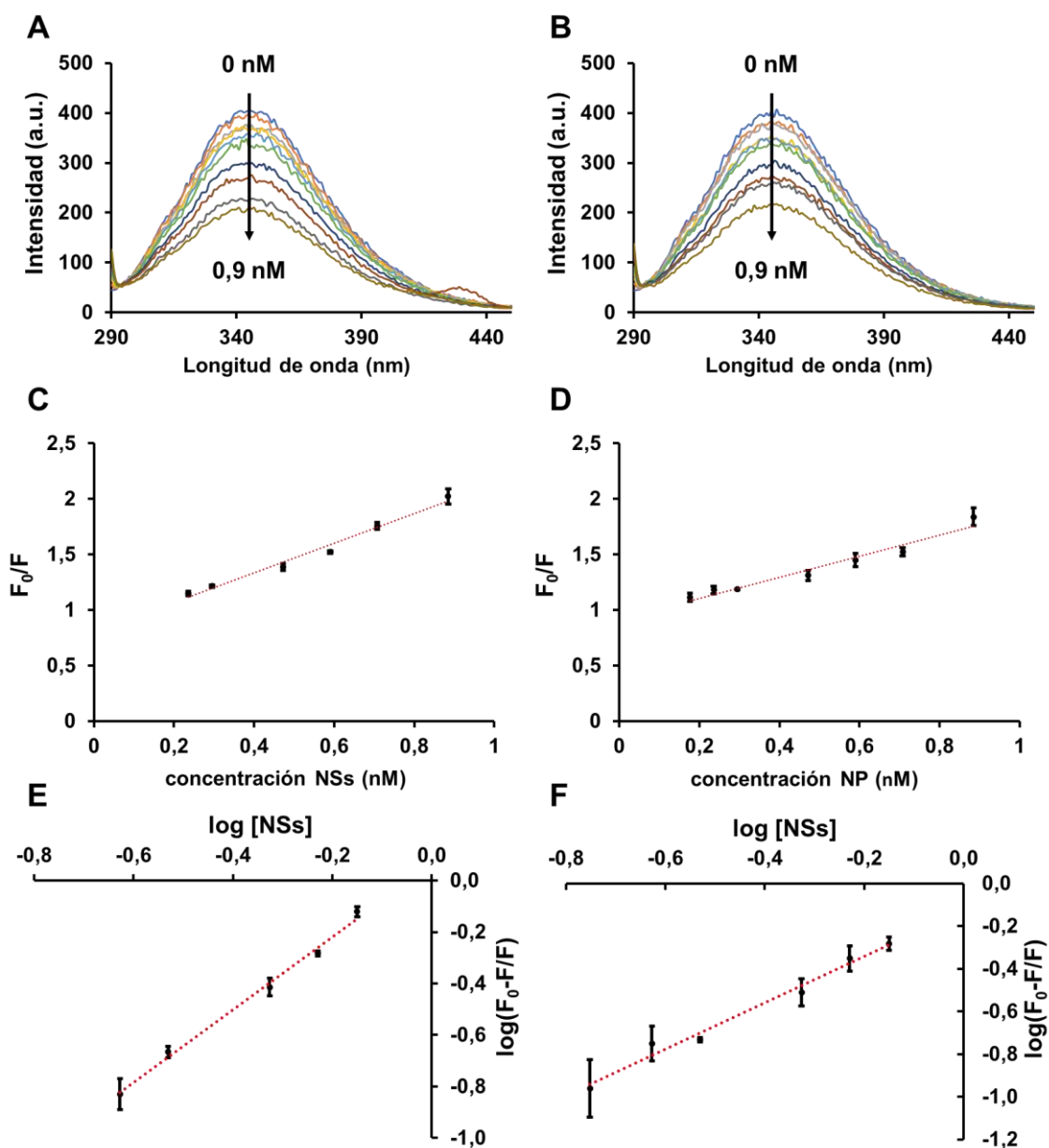


Figura 6. Espectro de emisión de fluorescencia  $\lambda_{ex} = 280$  nm NS-LA-PEG3kDa (A) y NS-LA-PEG3kDa-DOX (B), de la BSA en la ausencia y presencia. Gráficos de la ecuación de Stern-Volmer y gráfico logarítmico de la ecuación de Hill de la desactivación de la fluorescencia de la BSA. La BSA se incubó a una concentración de  $0,2 \mu\text{M}$  con las nanopartículas con un rango de concentraciones de  $0,06$ - $0,9$  nM.

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

En la representación de  $F_0/F$  frente a  $[Q]$  se obtiene una pendiente igual a la constante de desactivación de Stern-Volmer (Figura 6, C-D).<sup>37,38</sup> A partir de  $K_{SV}$ , se calcula la constante de desactivación bimolecular (Tabla 1) y se observa que en los dos casos es mayor de  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , que es considerado el valor máximo de la constante de desactivación controlada por difusión; por lo que se trata de un proceso de desactivación estático. En un proceso de desactivación estática, la ecuación de Hill puede emplearse para cuantificar la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de NP:

$$\log \frac{F - F_0}{F} = \log K_b - n \log[Q]$$

donde  $K_b$  es la constante de asociación. El coeficiente de Hill,  $n$ , describe el efecto cooperativo de la proteína unida a la superficie de la nanopartícula. Para un efecto cooperativo positivo,  $n > 1$ , esto implica que una vez que la proteína esté unida a la superficie de la nanopartícula, la afinidad a la nanopartícula aumenta progresivamente de forma lineal. Sin embargo, con un efecto cooperativo negativo la afinidad de unión de la proteína a la nanopartícula se vuelve progresivamente más débil a medida que se unen proteínas adicionales.<sup>39</sup> Mediante la representación doble logarítmica de  $\log \frac{F - F_0}{F}$  y  $\log[Q]$  se pueden calcular  $K_b$  y  $n$  de la intercepción y la pendiente respectivamente (Figura 6, E-F). Para ambos casos se obtiene un coeficiente de Hill  $> 1$  (Tabla 1), lo que sugiere que la interacción de unión tiene una cooperación positiva. Ello implica que la interacción de proteínas adicionales es favorable.<sup>39</sup> Estos resultados están en concordancia con lo publicado.<sup>31,40</sup>

## Capítulo 3

**Tabla 1.** Valores de las constantes de desactivación de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), constantes de asociación ( $K_b$ ) y coeficientes de Hill ( $n$ ) obtenidos de la interacción de las nanopartículas con Albúmina de Suero Bovino (BSA). Los resultados presentes corresponden a la media de las medidas de tres experimentos independientes.

Material	$K_{SV}$ ( $M^{-1}$ )	$k_q$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$n$
NS-LA-PEG3kDa	$1,34 \cdot 10^9$	$2,67 \cdot 10^{17}$	$6,92 \cdot 10^{12}$	1,42
NS-LA-PEG3kDa-DOX	$0,95 \cdot 10^9$	$1,90 \cdot 10^{17}$	$1,88 \cdot 10^9$	1,05

### 2.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno acelular

Habitualmente se considera que el mecanismo predominante para la citotoxicidad de nanopartículas es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se trata de una serie de pequeñas moléculas altamente reactivas como el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), que se originan de forma natural como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno molecular.<sup>41</sup> Los ROS intervienen en una serie de funciones biológicas pero en exceso son perjudiciales por lo que las células tienen mecanismos para mantener su homeostasis. Las nanopartículas pueden elevar los niveles de ROS intracelular de forma directa (procesos redox, generación de radicales) o indirecta (respuesta celular a la presencia del nanomaterial).

Se ha decidido estudiar el efecto de la funcionalización con DOX en la capacidad de las NS-LA-PEG3kDa para producir ROS. Para ello, para ambos materiales se ha estudiado por fluorescencia la producción de especies reactivas de oxígeno en ausencia de células. Para ello uno de los reactivos más populares es el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA) que fue inicialmente desarrollado para la detección de peróxido de hidrógeno en sistemas libres de células.<sup>42</sup> Posteriormente, se ha usado como herramienta para estudiar producción de ROS celular y acelular, que es el caso de los sistemas libres de células de la frase anterior, en presencia de un

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

nanomaterial.<sup>43</sup> Para la interacción de DCFH<sub>2</sub> con los ROS es necesario retirar el grupo funcional diacetato (DA). En ausencia de células, este grupo se puede retirar mediante la hidrólisis alcalina (Figura 7, A).<sup>42</sup>

La producción de ROS se estudia para diferentes concentraciones de nanopartículas de 0-0,7 nM tomando cuatro tiempos diferentes 0, 30, 60 y 90 min. En presencia de ROS se produce la oxidación de la DCFH<sub>2</sub>, que no es fluorescente, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que sí es fluorescente. Por lo tanto, la formación de ROS se puede evaluar mediante la medida de la intensidad de la fluorescencia (Figura 7, B). Ambos materiales producen la formación de ROS, si bien el aumento es menor para las nanopartículas funcionalizadas con DOX. Esto puede deberse a que la doxorubicina puede afectar a la permeabilidad del recubrimiento y la accesibilidad de especies químicas a la superficie metálica.

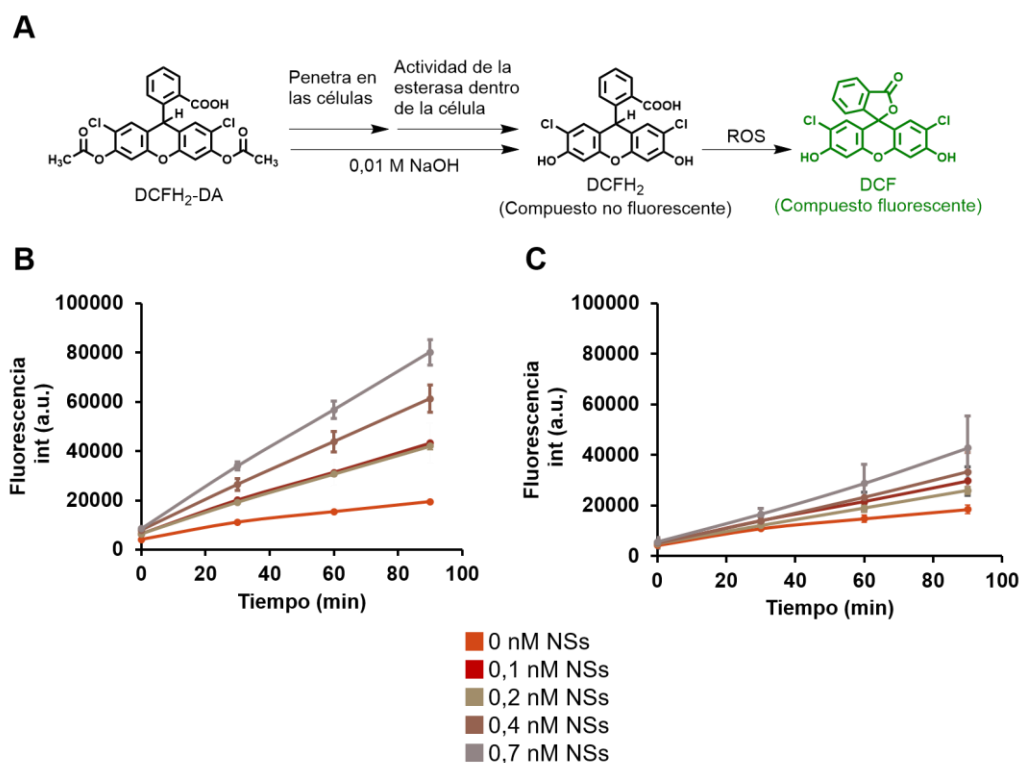


Figura 7. Reacciones del ensayo de determinación de ROS utilizando el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína en presencia y en ausencia de células (0,01 M NaOH) (A). Intensidad de la fluorescencia para las NS-LA-PEG3kDa (B) y las NS-LA-PEG3kDa-DOX (C).  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ .

## Capítulo 3

### 2.4 Actividad biológica de las nanoesferas con doxorrubicina

Para estudiar la toxicidad de las nanopartículas en ensayos *in vitro*, se seleccionan dos líneas celulares HEK-293 (células embrionarias de riñón) y MCF-7 (células de cáncer de mama). Las células HEK-293 se usan comúnmente en ensayos de toxicología de nanopartículas y suponen un buen modelo de células no cancerígenas. De esta manera, podemos evaluar posibles diferencias en la absorción de las nanopartículas en diferentes tipos celulares. Numerosos estudios evidencian la falta de homogeneidad de los resultados con un mismo material en diferentes líneas celulares.<sup>44</sup>

Se evalúa la internalización de los materiales por microscopía confocal láser de barrido (MCLB). En modo reflexión, la MCLB es una técnica similar a la microscopía de campo oscuro que permite visualizar la dispersión producida por objetos como las nanopartículas de oro. Las células HEK-293 y MCF-7 se incuban con NS-LA-PEG3kDa (6 nM) o NS-LA-PEG3kDa-DOX (6 nM) durante 24 h. Pasado el periodo de incubación, las células se fijan en metanol frío (-20 °C), y se tiñen con conjugado faloidina-fluoresceína (verde) y reactivo de Hoeschst (azul), para marcar la actina del citoesqueleto y los núcleos de las células respectivamente. Por otro lado, mediante las señales de reflectancia de MCLB (rojo) se pueden visualizar las nanopartículas de oro.

En la Figura 8, se presentan los resultados de microscopía confocal. Cuando las células se tratan con NS-LA-PEG3kDa no se produce internalización aparente de nanopartículas. Sin embargo, en la incubación con NS-LA-PEG3kDa-DOX se observan puntos rojos debido a la reflexión de las nanopartículas para ambas líneas celulares. Los valores de potencial  $\zeta$  son similares para ambos tipos de nanopartículas por lo que en este caso las interacciones electrostáticas no serían determinantes en la interacción de las nanopartículas con la membrana celular.<sup>45</sup> En cambio, la diferencia en la

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

internalización puede explicarse por las interacciones hidrofóbicas de la doxorubicina con la membrana celular. Un recubrimiento más hidrófobo favorecería el establecimiento de interacciones no específicas con la membrana.<sup>46</sup> Por otro lado, esta mayor hidrofobicidad puede producir también una mayor agregación de las nanopartículas en medio de cultivo, lo cual también puede inducir una mayor internalización de las nanopartículas.

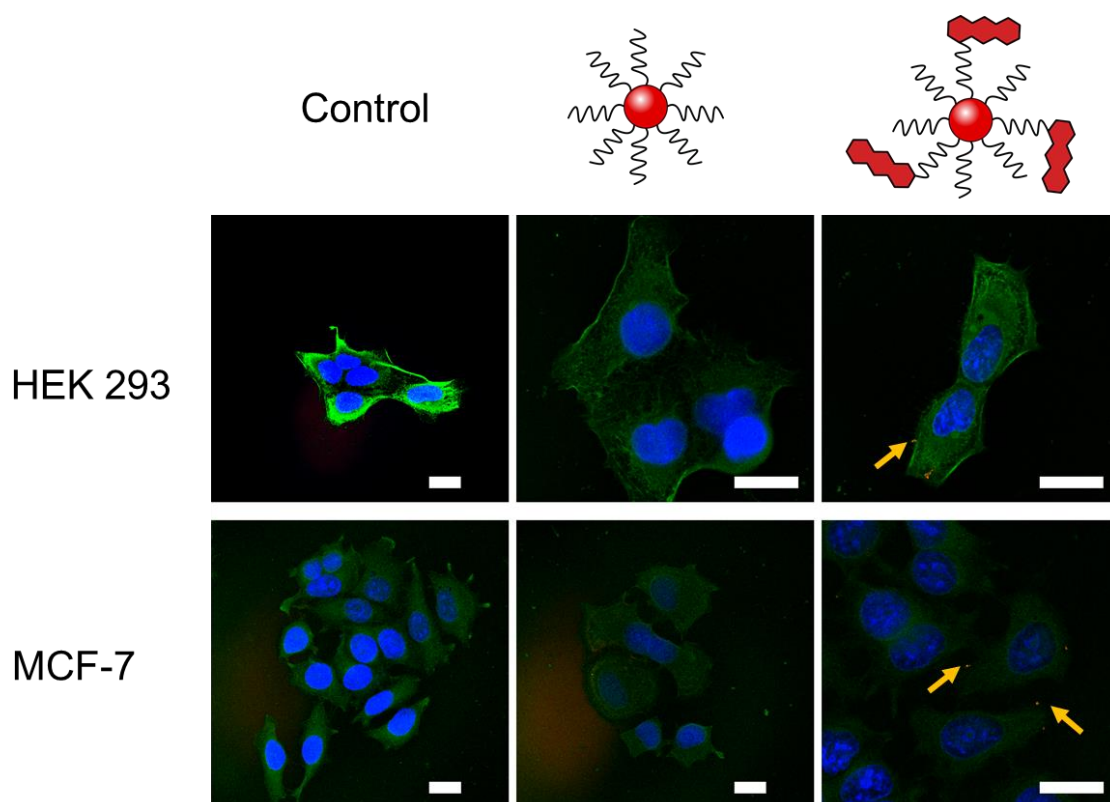


Figura 8. Imágenes de microscopía confocal en modo reflexión para evaluar la internalización de las nanopartículas en las células MCF-7 y HEK-293. Las células se incuban sin las NPs (control), y a 6 nM de NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX durante 24 h. Tras fijar las células, el núcleo de las células se tiñe con el reactivo de Hoeschst (azul), el citoesqueleto se marca con el conjugado faloidina-fluoresceína (verde) y mediante el modo reflexión del confocal se puede visualizar la dispersión provocada por las nanopartículas (rojo, señalados con flechas amarillas). Escala 20  $\mu\text{m}$ .

Antes de iniciar los ensayos de viabilidad, se plantea como hipótesis que la posible toxicidad provocada por la doxorubicina produzca daños en el ADN. Los daños de ADN se definen como cualquier modificación del ADN que cambia las propiedades de codificación o funciones de

### Capítulo 3

transcripción o replicación.<sup>47</sup> Cuando por alguna causa se rompe la doble cadena del ADN, se produce la fosforilación de la histona H2AX a  $\gamma$ H2AFX lo que actúa como señal para el reclutamiento de proteínas de señalización y reparación de ADN dañado. El uso de anticuerpos específicos para la histona fosforilada y marcados con un fluoróforo permite marcar el daño de ADN debido a ese mecanismo.<sup>48</sup> Las células MCF-7 se incuban con las NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX a 0,6 nM durante 1 h. Posteriormente, las células se tiñen con reactivo Hoeschst para visualizar los núcleos y los daños de ADN se determinan mediante el anticuerpo anti- $\gamma$ H2AFX-AF647. En la Figura 9, se observa que tras la incubación de las células con las nanopartículas no se producen daños significativos en el ADN (puntos rojos), y que las imágenes son parecidas a cuando las nanopartículas no tienen doxorubicina.

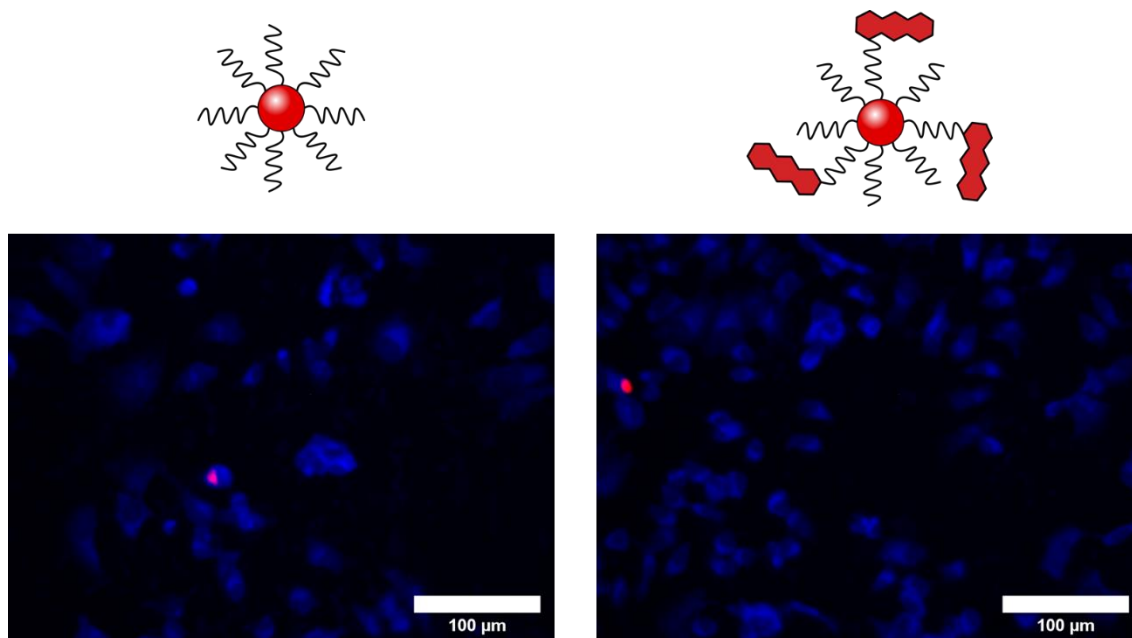


Figura 9. Imagen de microscopia de fluorescencia (EVOS) para evaluar los posibles daños del ADN de las células MCF-7 cuando se incuban con 0,6 nM de NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX durante 1 h. El núcleo de las células se tiñe con reactivo de Hoeschst (azul) y inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX (rojo) usando un anticuerpo anti- H2AX-AF647. Escala 100  $\mu$ m.



## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

Una vez estudiada la internalización y los posibles daños en las moléculas de ADN, se pasa a evaluar la toxicidad de estas nanopartículas en ensayo con el reactivo MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. El reactivo MTS es un compuesto perteneciente a la familia de las sales de tetrazolio. Es un ensayo colorimétrico que cuantifica la actividad metabólica de las células en las mitocondrias.<sup>52,53</sup> Cuando las células están vivas, este componente celular es capaz de reducir el reactivo de MTS a una sal soluble de formazán en agua. Se puede medir la absorbancia a 490 nm. Se ha comparado el efecto de la dosis cuando las líneas celulares MCF-7 y HEK-293 se tratan con NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX a un rango de concentraciones (0,6, 1,5, 3, 4,5 y 6 nM) que se corresponden con dosis de doxorubicina de 12 hasta 123  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 10). También se estudia la toxicidad de la doxorubicina libre en las mismas concentraciones que en los ensayos con las nanopartículas. Como control positivo de muerte se utiliza una muestra de 10% de DMSO.

### Capítulo 3

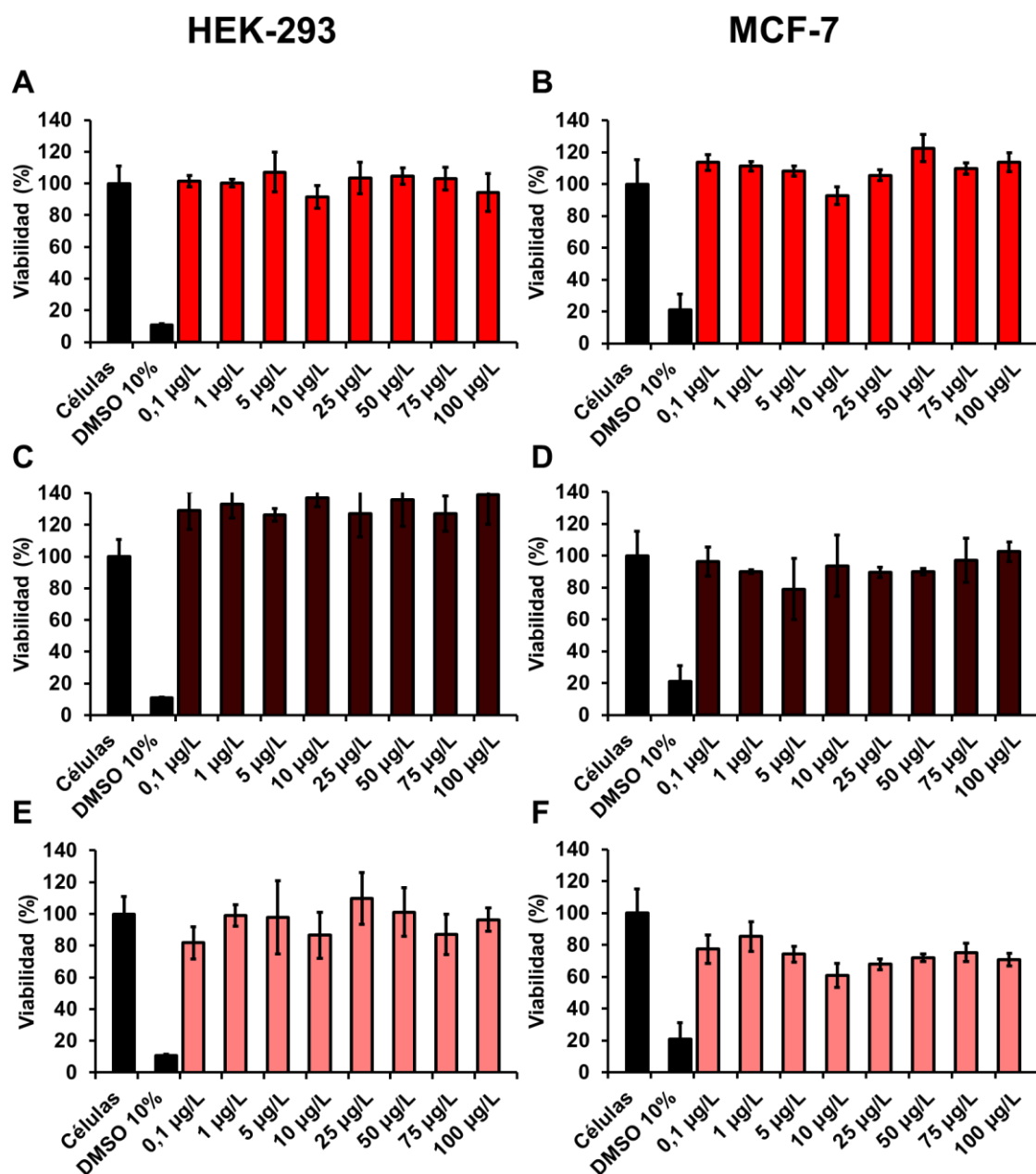


Figura 10. Ensayo MTS para determinar la viabilidad de las células HEK-293 (izquierda) y MCF-7 (derecha) en presencia de doxorubicina (A-B), NS-LA-PEG3kDa (C-D), NS-LA-PEG3kDa-DOX (E-F) a diferentes concentraciones en un rango de 0,1-100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de DOX durante 24 h

Cuando se utiliza la doxorubicina sola, no se produce una disminución de la viabilidad en el rango de concentraciones elegido. Cuando se tratan las células HEK-293 con las NS-LA-PEG3kDa aumenta el valor de viabilidad por encima del 110 %. Esto puede deberse a la interferencia que provocan las nanopartículas, que tienen el máximo de absorción cercano al 140

## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

reactivo de MTS ( $\lambda_{\text{LSPR}} = 523 \text{ nm}$ ). En el caso de las células MCF-7, la viabilidad se mantiene en un 100% para todas las concentraciones de nanopartículas NS-LA-PEG3kDa. Con respecto a las NS-LA-PEG3kDa-DOX, el porcentaje de viabilidad disminuye en ambas líneas celulares si se compara con las NS-LA-PEG3kDa. Esto puede deberse a la toxicidad que presentan estas nanopartículas funcionalizadas con la doxorubicina. Esta diferencia es más drástica en el caso del modelo de las células cancerígenas, obteniéndose valores de viabilidad por debajo del 80%.

Para evitar la interferencia de las nanopartículas, se elige estudiar la toxicidad por medio de citometría de flujo. La citometría de flujo es una de las técnicas más extendidas y versátiles para estudiar los mecanismos de muerte de las células. Esta técnica ofrece la posibilidad de estudiar las células por separado y no como un grupo de células como es el caso del MTS. Además, permite examinar la expresión de muchas proteínas como marcadores celulares específicos e indicadores de apoptosis.<sup>49</sup> Las células se incuban con anexina V y yoduro de propidio (PI), que son marcadores que permiten categorizar las células en vivas, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necróticas por medio de cambio morfológicos en el núcleo y membrana celulares. La anexina V tiene gran afinidad por el fosfolípido aniónico fosfatidilserina, que en células sanas se encuentra en la cara interna de la membrana celular. Sin embargo, la membrana sufre una serie de cambios durante la apoptosis que incluyen la translocación de la fosfatidilserina a la cara extracelular de la membrana. Como la anexina V es demasiado grande para permear a través de la membrana solo puede marcar la fosfatidilserina cuando está en la cara extracelular de la membrana, es decir, en células apoptóticas que quedan marcadas de color verde. Por su parte, el PI penetra cuando la membrana celular está dañada, que es el caso

### Capítulo 3

de células apoptóticas tardías o muertas. En este caso se une al ADN que queda marcado fluorescentemente de color rojo.<sup>49</sup>

Los resultados de citometría muestran que en los controles de células sin nanopartículas se aprecia un pequeño porcentaje, menor al 20%, de muerte celular y apoptosis temprana en ambas líneas celulares (Figura 11). Asimismo, la doxorubicina libre no produce toxicidad entre 12 y 123  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en las líneas celulares estudiadas tal y como se presenta en otros ejemplos en la bibliografía.<sup>50</sup> Asimismo, se añade dos controles de toxicidad positivo: una alta concentración de doxorubicina (DOX control, 100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y DMSO al 10%. En las células MCF-7, se produce un mayor porcentaje de células apoptóticas (13%). Cuando se tratan las HEK-243 con NS-LA-PEG3kDa (Figura 11, C), es decir, nanopartículas sin doxorubicina, se produce una pequeña disminución de la viabilidad a las dos concentraciones más altas de nanopartículas quedándose esta en torno al 80%, mientras que en las MCF-7 se mantiene la viabilidad por encima del 95% (Figura 11, D). Con respecto a las NS-LA-PEG3kDa-DOX, las concentraciones estudiadas no producen citotoxicidad en las células HEK-293 (Figura 11, E). Por el contrario, cuando estas nanopartículas se incuban con las MCF-7, la viabilidad disminuye a medida que aumenta la concentración de las nanopartículas hasta un 60% (Figura 11, F).

## Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX

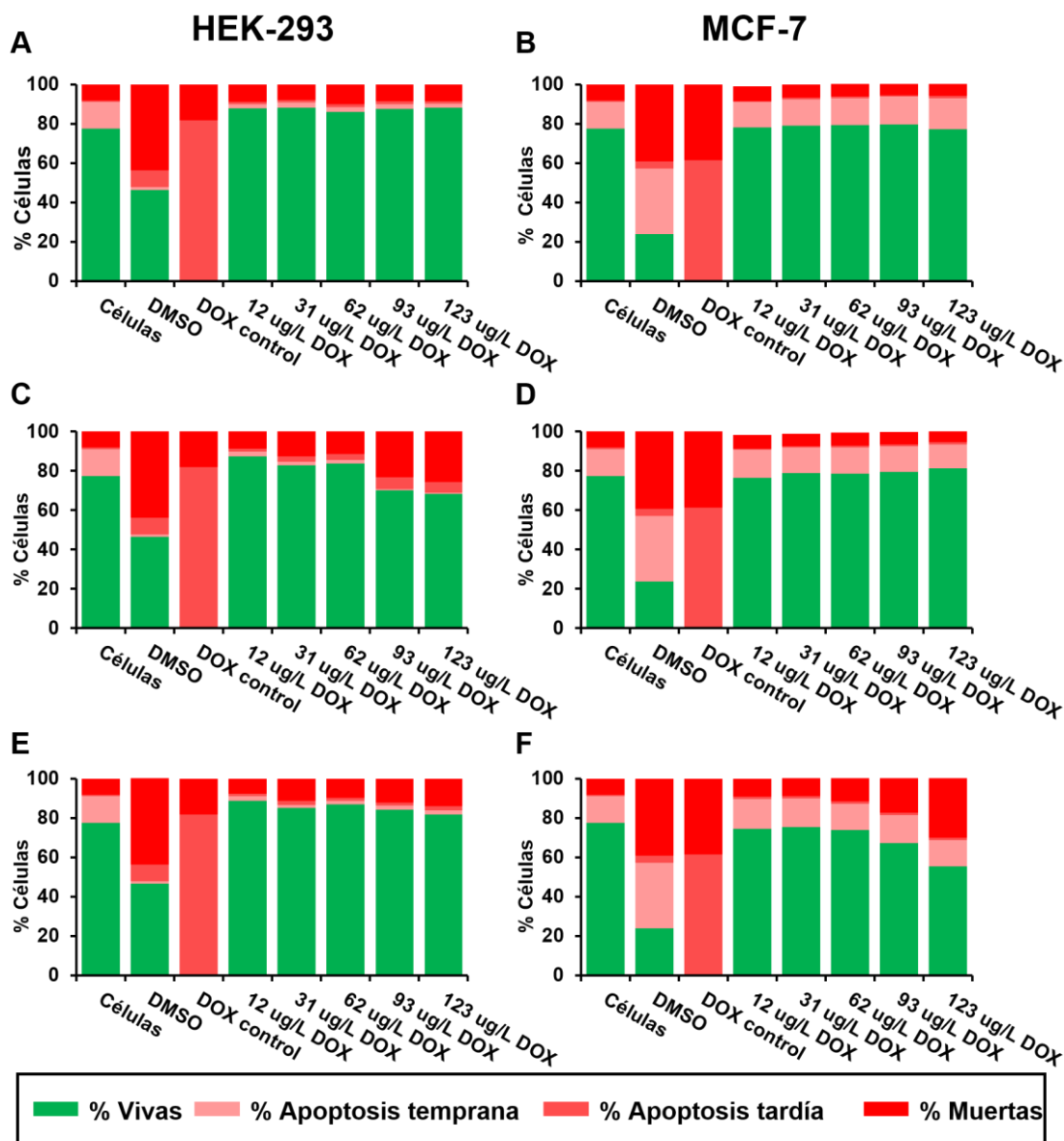


Figura 11. Ensayo de citometría de flujo para determinar la viabilidad de las células HEK-293 (izquierda) y MCF-7 (derecha) en presencia de doxorrubicina (A-B), NS-LA-PEG3kDa (C-D) y NS-LA-PEG3kDa-DOX (E-F) a diferentes concentraciones en un rango de 12-123  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de DOX durante 24 h. Se añade dos controles positivos de toxicidad: uno con DMSO 10% y otro a una concentración de DOX alta (DOX control, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En C y D las concentraciones de DOX no son reales, sino que expresan que hay una concentración de nanopartículas equivalente a la de E y F para esas concentraciones de DOX.

El efecto diferente en varias líneas celulares puede depender de muchos factores como el metabolismo, la expresión de receptores o el contacto célula-célula.<sup>44</sup> Sin embargo, los valores de efectividad de este

### Capítulo 3

sistema de transporte de doxorubicina son muy reducidos. Se pueden encontrar diversas causas a este problema, como la baja carga de doxorubicina presente en las nanopartículas (400 DOX/NP) comparado con otros sistemas publicados que presentan hasta 20 veces más carga de doxorubicina (8400 DOX/NP).<sup>19</sup> Por otro lado, aunque se encuentran ejemplos de liberación del recubrimiento por interacciones con el GSH,<sup>21</sup> tal vez el PEG dificulte la entrada del tripéptido a la superficie de la nanopartícula.

Posibles soluciones a este problema serían usar moléculas específicas que interaccionen con receptores de membrana y realizar una terapia dirigida, siendo conocido este proceso como nanotransportadores de segunda generación.<sup>51</sup> Esta terapia combinada puede hacerse, bien por terapia fotodinámica mediante la unión de un agente fotosensible para producir el cambio de conformación de las cadenas de PEG u otro polímero, o bien mediante el uso de nanopartículas anisótropas como nanoprismas, nanoestrellas o nanocajas funcionalizadas con el agente antitumoral. Ambas estrategias buscan la combinación de la quimioterapia con la terapia fototérmica y muchos trabajos se están centrando en esta estrategia en los últimos años.<sup>52-54</sup>

### 3. CONCLUSIONES

Los resultados indican que las nanopartículas funcionalizadas con doxorubicina son más estables cuando se usa el LA-PEG3kDa con respecto al PEG3kDa. Dados los resultados expuestos en el Capítulo 2, la mejora de estabilidad se explica sobre todo por la pequeña cadena alifática que presenta. El sistema elegido presenta unas buenas propiedades coloidales y una interacción débil con las proteínas, que no produce la modificación de la

## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

estructura secundaria de la BSA. Tampoco se produce una concentración alta de especies reactivas de oxígeno, que podría desfavorecer el uso de estas nanopartículas.

Se ha observado una mejor respuesta de las nanopartículas con DOX en modelos de cáncer de mama, debido a su mayor sensibilidad a elementos tóxicos. No obstante, no se produce una respuesta suficiente de muerte celular y se requiere una mejora del modelo utilizado.

La carga de doxorubicina que se puede unir a la nanopartícula es muy baja, impidiendo hacer comparaciones con cantidades de doxorubicina más tóxica puesto que estamos limitados por la concentración de nanopartículas.

La unión de moléculas capaces de interaccionar con receptores sobre-expresados en las membranas de la célula diana permitiría un tratamiento más selectivo y eficaz, permitiendo el uso de menores concentraciones de nanopartícula.

El siguiente paso sería aplicar este modelo con los nanoprismas de oro, y estudiar si se pudiese hacer una terapia combinada de quimioterapia y fototerapia.

### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1 Materiales y equipos

El ácido nítrico al 65%, el ácido clorhídrico al 37%, el ácido sulfúrico al 96%, el peróxido de hidrógeno al 33% y el tris(hidroximetil)aminometano se compraron de Panreac®. HS-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CONH-PEG-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-COOH (MW = 3000 g/mol, HS-PEG-COOH) se adquirió de Rapp Polymere. El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) se adquirió de Alpha Aesar. Hidróxido de sodio (NaOH), dodecilsulfato de sodio (SDS), sal de sodio de *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) y clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) fueron suministrados por Sigma-Aldrich y utilizados como se recibieron. Antes de su uso en la síntesis de nanoesferas de oro, toda la cristalería se lavó con agua regia (1: 3 vol/vol ácido nítrico, 65%: ácido clorhídrico, 37%) y se enjuagó a fondo con agua Milli-Q de Millipore Q- Sistema POD®. Los espectros UV-Vis-NIR se adquirieron usando un espectrofotómetro Cary 50 Probe® de Varian.

Las medidas de fluorescencia en el caso de la doxorrubicina se hicieron con un espectrofotómetro de fluorescencia, LS 55 (Perkin-Elmer, Reino Unido) equipado con una lámpara de xenón como fuente de excitación.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial  $\zeta$  se midieron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado con un láser verde (523 nm).

Los cambios en la estructura de la proteína se evaluaron mediante espectroscopía de dicroísmo circular utilizando un espectrómetro Jasco J-810 CD (Jasco Corp. Japón).

Para determinar el coeficiente de unión, se registraron los espectros de fluorescencia usando un espectrofotómetro de fluorescencia Agilent Cary



## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

Eclipse. Los experimentos de citometría de flujo se llevaron a cabo en un Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, EE: UU.) equipado con un láser de 488 nm. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron usando un microscopio confocal de barrido. Leica TCS-SPE (Leica, Munich, Alemania).

## **4.2 Funcionalización de las nanoesferas**

### **4.2.1 Funcionalización de las nanoesferas de citrato con PEG (NS-PEG)**

En tubo Falcon de 50 mL (estéril, envuelto en papel de aluminio), se mezcla 10 nM de NS-Cit (se prepararon siguiendo el procedimiento del Capítulo 2), 0.028% SDS, HS-PEG-COOH (6 mg, 2  $\mu$ mol), NaOH hasta una concentración final de 25 mM en un volumen total de 50 mL. La mezcla se deja agitando durante 16 h. Luego de la incubación, se lava 3 veces con agua Milli-Q por centrifugación a 16000 g a 4 °C durante 45 min. Al finalizar el último paso de centrifugación, el pellet de nanopartículas se resuspende en 5 mL de agua Milli-Q.

### **4.2.2 Funcionalización de las NS-LA-PEG3kDa con la doxorrubicina**

20 pmol de NS-LA-PEG3kDa disueltos en agua se activaron con 40  $\mu$ g de EDC y 61  $\mu$ g de sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, las NS-LA-PEG3kDa se centrifugaron 16000 g a 4 °C durante 45 min. Se retiró el sobrenadante y las nanopartículas se resuspendieron en tampón borato de sodio 10 mM pH 8 y se añadieron diferentes cantidades de doxorrubicina (4, 8, 12 y 16 nmol). La mezcla resultante se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 14  $\mu$ g de tris(hidroximetil)aminometano (120 nmol) para

## Capítulo 3

bloquear los grupos carboxílicos activados restantes durante otras 2 h a temperatura ambiente. Las NPs funcionales se centrifugaron 4 veces a 16000 g a 4 °C durante 45 min. Para los primeros tres lavados las NPs se resuspendieron con una disolución de NaCl 1 M + Tween 0,1%. Para el último lavado se resuspendieron con agua Milli-Q. Las nanopartículas se resuspendieron en 500 µL de volumen final.

### 4.3 Caracterización de los materiales

Para las medidas de fluorescencia de la doxorubicina, se seleccionó una apertura de la banda de absorción y de excitación de 7.5 nm, y una velocidad de barrido de 800 nm/min. La doxorubicina se excitó a 473 nm, y se recogió la fluorescencia a 592 nm. Las muestras se colocaron en una cubeta Hellma 105.251-QS con un camino óptico de 3 x 3 mm, y se analizaron 500 µL de muestra.

Los cambios en la estructura de la proteína se evaluaron mediante espectroscopía de dicroísmo circular utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Se varió la concentración de nanopartículas entre 0,6-6 nM mientras que la concentración de la BSA se mantuvo constante a 10 µM. Previo a las medidas, las nanopartículas se mezclaron con la proteína y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Después, se registró el espectro entre 190 a 250 nm de longitud de onda bajo flujo de nitrógeno. Los resultados se presentan como porcentaje del cambio en la estructura secundaria de la proteína obtenida mediante el *software* del instrumento.

Para determinar el coeficiente de unión, se registraron los espectros de fluorescencia usando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Se varió la concentración de nanopartículas en el intervalo 0,06-0,9 nM mientras que la

## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

concentración de la BSA se mantuvo constante a 0,2  $\mu$ M. Antes de las medidas, las nanopartículas se incubaron con la BSA durante 10 min a temperatura ambiente. Para las medidas de fluorescencia la apertura de la banda de excitación y emisión se fijó en 5,0 y 10,0 nm, respectivamente. El espectro de emisión se midió desde 200 a 450 nm mientras que se usó una longitud de excitación de 280 nm. Los resultados se representan como el logaritmo de la constante de unión calculada a partir de la concentración de oro y utilizando la ecuación de Stern-Volmer.

La estabilidad de las nanopartículas preparadas se evaluó en medio de relevancia biológica a través de los cambios del diámetro hidrodinámico y del potencial  $\zeta$ . Las nanopartículas se incubaron en agua milli-Q y medio de cultivo celular para experimentos en células sin suero (DMEM) y con la adición de suero fetal de bovino (DMEM+FBS) durante 0, 1, 4 y 24 h. Todos los experimentos se hicieron a 37 °C y con una concentración de nanopartículas 0,6 nM. La distribución de tamaños se expresa como media de valores de 10 medidas en volumen. La carga superficial se evaluó por valores de potencial  $\zeta$  obtenidas a partir de 5 medidas.

### **4.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno acelar (ROS)**

#### **4.4.1 Preparación de la disolución de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH)**

Se preparó una disolución del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>.DA) 10 mM. 130  $\mu$ L de disolución se mezclaron con 1,17 mL de metanol. Se mantuvo la mezcla durante 4 h en hielo y tapada de la luz. Posteriormente, se añadieron 5,2 mL de NaOH 0,01M y la mezcla se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente.

## Capítulo 3

Para parar la reacción se añadieron 19,5 mL de PBS. Finalmente, la mezcla se diluyó 1:10 en PBS para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  de DCFH<sub>2</sub>.

### 4.4.2 Determinación de ROS celular producido por las nanoesferas

Para determinar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), se mezclaron 25  $\mu\text{L}$  de NS-PEG a diferentes concentraciones en un rango de 0-0,7 nM y 225  $\mu\text{L}$  de DCFH<sub>2</sub> a 10  $\mu\text{M}$ . Inmediatamente después, se midió la fluorescencia, excitando la muestra a 458 nm y se registró la emisión a 530 nm usando un lector de placas. También, se registró la fluorescencia después de 30, 60 y 90 min.

Para determinar la interferencia de las nanopartículas por desactivación de la fluorescencia, se mezcló 25  $\mu\text{L}$  NS-PEG a diferentes concentraciones en un rango de 0-0,7 nM (misma concentración que en el ensayo) y 225  $\mu\text{L}$  de fluoresceína a 0,1  $\mu\text{M}$ . Inmediatamente después, se midió la fluorescencia, excitando la muestra a 458 nm y se registró la emisión a 530 nm usando un lector de placas. Para el cálculo de la desactivación de fluorescencia, se determinó la señal de fluoresceína en presencia y en ausencia de nanopartículas. Se obtuvo una disminución de la fluorescencia de un 9,9 % y 10,4 % para las NS-LA-PEG3kDa y NS-LA-PEG3kDa-DOX, respectivamente, en la concentración más alta. Se considera aceptable por debajo de un 30%.

Para determinar la auto-fluorescencia de las nanopartículas, se repite el ensayo anterior sustituyendo la fluoresceína por PBS. Para el cálculo de la auto-fluorescencia, se compara el aumento de la señal de fluorescencia cuando las nanopartículas están ausentes y cuando están presentes. Se obtuvo un aumento de señal de 1,1x para NS-LA-PEG3kDa y 1,2x para las NS-LA-

## **Evaluación de nano-bio-interacciones de NPs recubiertas con DOX**

PEG3kDa-DOX en la concentración más alta. Se considera aceptable por debajo de 1,5x.

### **4.5 Actividad biológica de las nanoesferas con doxorubicina**

Las células HEK-293 se sembraron en Medio Esencial Mínimo (Sigma Aldrich, EE. UU.) suplementado con 10% de FBS (Sigma Aldrich, EE. UU.) inactivado por calentamiento (HI-FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich, EE. UU.) en una botella de cultivo T75 (Eppendorf, Alemania). Las células MCF-7 se sembraron en DMEM alto en glucosa (Sigma Aldrich, EE. UU.) suplementado con 10% de HI-FBS y 1% de penicilina/estreptomicina en una botella de cultivo T75. Las células se sembraron cuando se alcanzó un 80% de confluencia.

#### **4.5.1 Estudios internalización por microscopía confocal**

La internalización celular de las nanopartículas se visualizó mediante microscopía de barrido confocal en modo reflexión. Se sembraron  $2 \cdot 10^4$  células/pocillo en placas de 12 pocillos que contenían cubreobjetos para después fijar las células. Se dejaron incubando las células toda la noche para que se adhirieran al cubreobjetos. Se añadieron las nanopartículas a una concentración de 6 nM y se dejó incubando durante 4 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 3 min, seguido de lavados con PBS. Se usó una disolución de 0,1% Tritón X-100 en PBS para desnaturalizar la membrana, después las células se lavaron con PBS. Las células se tiñeron con una disolución de conjugado faloidina-fluoresceína ( $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 20 min. El exceso de colorante se lavó con PBS. Posteriormente, se tiñó el núcleo con tinción de Hoechst a una concentración de  $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 15 min. Las células se lavaron tres

## Capítulo 3

veces con PBS. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Fluoroshield Antifade y las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal de barrido.

### 4.5.2 Ensayo de daños en el ADN

Las células se sembraron en placa de 96 de pocillos negra (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) a  $2 \cdot 10^3$  células por pocillo. Se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El día siguiente, las células se trataron con de nanopartículas (0,06 nM). Después de 1h de incubación a 37 °C en condiciones de cultivo, se retiró el medio de los pocillos, y se lavó con 200 µL/pocillo de PBS. Después de retirar el PBS, se trataron las células con metanol frío (-20° C, Kemika, Croacia) durante 5 min seguido de otro lavado con PBS. Posteriormente, se usó una disolución de 0,1% Tritón X-100 en PBS para desnaturalizar la membrana. La placa se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, y se volvió a lavar con PBS. A continuación, se tiñó el núcleo con tinción de Hoechst a una concentración de 10 µg/mL (preparado en PBS con la adición de Tritón X-100 0,1% v/v) durante 15 min a temperatura ambiente. El colorante se retiró de los pocillos, y se lavó dos veces con 200 µL/pocillo de PBS. Posteriormente, se añadieron 40 µL/pocillo de la solución del anticuerpo γH2AX-AF647 (Abcam, ab195189, 5 µg·mL<sup>-1</sup> en PBS con la adición de Tritón X-100 0,1% v/v) y se dejó incubando 60 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después de retirar la disolución del anticuerpo, los pocillos se lavaron una vez con PBS. Se añadió PBS fresco para la microscopía (100 µL/pocillo) y las imágenes se adquirieron inmediatamente con un sistema de imagen EVOS M700 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) a 20 x magnificaciones. Los canales adquiridos por separado se combinaron usando el editor ImageJ (Universidad de Wisconsin, EE. UU.).

### 4.5.3 Ensayo de viabilidad celular por MTS

Las células MCF-7 y HEK-293 se sembraron a una densidad de  $2 \cdot 10^3$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. Después de 24 h, el medio se reemplazó por medio de cultivo nuevo que contenía las nanoesferas de oro (0,6, 1,5, 3, 4,5 y 6 nM) y se incubó durante otras 24 h en las mismas condiciones. Para cuantificar la viabilidad de las células mediante el ensayo MTS, se retiró el medio y las células se incubaron en una mezcla de DMEM (80  $\mu$ L) con una disolución acuosa de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (20  $\mu$ L, 5 mg·mL<sup>-1</sup>), en la oscuridad en condiciones de cultivo durante 1 h para las MCF-7 y 3 h para la HEK-293. Pasado ese tiempo, se registró la absorción a 490 nm (OD) usando un lector de placas. El porcentaje de viabilidad celular de cada muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula con 100  $\mu$ L de PBS como blanco:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{OD \text{ de la muestra tratada} - OD \text{ del blanco}}{OD \text{ del control de células sin NPs} - OD \text{ del blanco}} \cdot 100$$

### 4.5.4 Ensayo de viabilidad celular por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron  $1 \cdot 10^5$  células durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo de los pocillos. Posteriormente, se añadieron 900  $\mu$ L de medio fresco, seguidos de 100  $\mu$ L de disolución concentrada de nanopartículas en PBS. Para los controles negativos, se añadió PBS y se usó DMSO (10%) y una alta concentración de doxorubicina (100 mg·mL<sup>-1</sup>) como control positivo de toxicidad. Las células se tiñeron con el kit Annexina V y PI (Biorad, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del

### Capítulo 3

fabricante. Los porcentajes de células vivas y muertas se obtuvieron con el *software* de citometría de flujo, FlowJo (FlowJo LLC, EE. UU.).



## **5. AGRADECIMIENTOS**

Parte de los resultados expuestos en este capítulo se obtuvieron en el laboratorio de la Dra. Ivana Vinković Vrček. Quiero agradecer a ella y a todo su equipo la acogida. Agradecer a Dr. Ivan Pavičić, Rinea Babir, Krunoslav Ilić, Emerik Galic y Barbara Pem por enseñarme a utilizar las diferentes técnicas utilizadas en este capítulo.

Some of the results shown in this chapter were obtained in Dr. Ivana Vinković Vrček's laboratory. I would like to thank her and all her team. Especial thanks to Dr. Ivan Pavičić, Rinea Babir, Krunoslav Ilić, Emerik Galic and Barbara Pem for teaching me the different biocharacterization techniques of the nanomaterials.

## **6. REFERENCIAS**

- (1) Jahangirian, H.; Kalantari, K.; Izadiyan, Z.; Rafiee-Moghaddam, R.; Shameli, K.; Webster, T. J. A Review of Small Molecules and Drug Delivery Applications Using Gold and Iron Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 1633–1657. <https://doi.org/10.2147/IJN.S184723>.
- (2) Edgar, J. Y. C.; Wang, H. Introduction for Design of Nanoparticle Based Drug Delivery Systems. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (14). <https://doi.org/10.2174/1381612822666161025154003>.
- (3) Martín-Rapun, R.; De Matteis, L.; Ambrosone, A.; Garcia-Embid, S.; Gutierrez, L.; de la Fuente, J. M. Targeted Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (13), 1927–1952. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161226151011>.
- (4) Park, S. J. Protein–Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 5783–5802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254808>.
- (5) Mieszawska, A. J.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Cormode, D. P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of

### Capítulo 3

- Disease. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (3), 831–847. <https://doi.org/10.1021/mp3005885>.
- (6) Muthuraman, A.; Rishitha, N.; Mehdi, S. Role of Nanoparticles in Bioimaging, Diagnosis and Treatment of Cancer Disorder. In *Design of Nanostructures for Theranostics Applications*; Elsevier, 2018; pp 529–562. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813669-0.00013-0>.
- (7) Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (46), 12320–12364. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>.
- (8) Huda, S.; Alam, M. A.; Sharma, P. K. Smart Nanocarriers-Based Drug Delivery for Cancer Therapy: An Innovative and Developing Strategy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60* (May), 102018. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102018>.
- (9) Lenci, E.; Trabocchi, A. Peptidomimetic Toolbox for Drug Discovery. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (11), 3262–3277. <https://doi.org/10.1039/d0cs00102c>.
- (10) Connor, D. M.; Broome, A. M. Gold Nanoparticles for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *139*, 163–184. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.05.001>.
- (11) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* **2010**, *6* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>.
- (12) Yang, Y.; Ren, L.; Wang, H. Strategies in the Design of Gold Nanoparticles for Intracellular Targeting: Opportunities and Challenges. *Ther. Deliv.* **2017**, *8* (10), 879–897. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0049>.
- (13) Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **2007**, *7* (6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>.
- (14) Carvalho, C.; Santos, R.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P.; Santos, M.; Moreira, P. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (25), 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>.
- (15) Thorn, C. F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T. E.; Altman, R. B. Doxorubicin Pathways. *Pharmacogenet. Genomics* **2011**, *21* (7), 440–446.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.

- (16) Vejpongsa, P.; Yeh, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *64* (9), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>.
- (17) Matyszcewska, D. Drug Delivery Systems in the Transport of Doxorubicin. *Surf. Innov.* **2014**, *2* (4), 201–210. <https://doi.org/10.1680/si.13.00040>.
- (18) Sanvicens, N.; Marco, M. P. Multifunctional Nanoparticles - Properties and Prospects for Their Use in Human Medicine. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (8), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
- (19) Wang, F.; Wang, Y. C.; Dou, S.; Xiong, M. H.; Sun, T. M.; Wang, J. Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS Nano* **2011**, *5* (5), 3679–3692. <https://doi.org/10.1021/nn200007z>.
- (20) Gu, Y. J.; Cheng, J.; Man, C. W. Y.; Wong, W. T.; Cheng, S. H. Gold-Doxorubicin Nanoconjugates for Overcoming Multidrug Resistance. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.005>.
- (21) Zhang, X.; Chibli, H.; Mielke, R.; Nadeau, J. Ultrasmall Gold-Doxorubicin Conjugates Rapidly Kill Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (2), 235–243. <https://doi.org/10.1021/bc100374p>.
- (22) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Focella, T. M.; Smilowitz, H. M. Gold Nanoparticles: A New X-Ray Contrast Agent. *Br. J. Radiol.* **2006**, *79* (939), 248–253. <https://doi.org/10.1259/bjr/13169882>.
- (23) Bieri, M.; Bürgi, T. L-Glutathione Chemisorption on Gold and Acid/Base Induced Structural Changes: A PM-IRRAS and Time-Resolved in Situ ATR-IR Spectroscopic Study. *Langmuir* **2005**, *21* (4), 1354–1363. <https://doi.org/10.1021/la047735s>.
- (24) Ghosh, G.; Panicker, L. Protein–Nanoparticle Interactions and a New Insight. *Soft Matter* **2021**, *17* (14), 3855–3875. <https://doi.org/10.1039/D0SM02050H>.
- (25) Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-Nanoparticle Interactions. *Nano Today* **2008**, *3* (1–2), 40–47. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70014-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70014-8).
- (26) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials. *Nat.*

### Capítulo 3

- Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779–786.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.
- (27) Woody, R. W. [4] Circular Dichroism; 1995; pp 34–71.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)46006-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)46006-3).
- (28) Wangoo, N.; Suri, C. R.; Shekhawat, G. Interaction of Gold Nanoparticles with Protein: A Spectroscopic Study to Monitor Protein Conformational Changes. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92* (13), 1–4.  
<https://doi.org/10.1063/1.2902302>.
- (29) Wang, G.; Wang, W.; Shangguan, E.; Gao, S.; Liu, Y. Effects of Gold Nanoparticle Morphologies on Interactions with Proteins. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *111* (November 2018), 110830.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110830>.
- (30) Manivel, A.; Anandan, S. Spectral Interaction between Silica Coated Silver Nanoparticles and Serum Albumins. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *395*, 38–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.001>.
- (31) Barbir, R.; Jiménez, R. R.; Martín-Rapún, R.; Strasser, V.; Domazet Jurašin, D.; Dabelić, S.; de la Fuente, J. M.; Vinković Vrček, I. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (23), acsami.1c04063. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04063>.
- (32) Ghisaidoobe, A. B. T.; Chung, S. J. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (12), 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>.
- (33) Teale, F. W. J.; Weber, G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. *Biochem. J.* **1957**, *65* (3), 476–482.  
<https://doi.org/10.1042/bj0650476>.
- (34) Naveenraj, S.; Anandan, S.; Kathiravan, A.; Renganathan, R.; Ashokkumar, M. The Interaction of Sonochemically Synthesized Gold Nanoparticles with Serum Albumins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (3), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.039>.
- (35) Shang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Dong, S. PH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study. *Langmuir* **2007**, *23* (5), 2714–2721. <https://doi.org/10.1021/la062064e>.
- (36) Mariam, J.; Dongre, P. M.; Kothari, D. C. Study of Interaction of Silver

- Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *J. Fluoresc.* **2011**, *21* (6), 2193–2199. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0922-3>.
- (37) Lakowicz, J. R. Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, 2006; pp 277–330. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_8).
- (38) Mariam, J.; Sivakami, S.; Dongre, P. M. Elucidation of Structural and Functional Properties of Albumin Bound to Gold Nanoparticles. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35* (2), 368–379. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1144223>.
- (39) Wang, G.; Yan, C.; Gao, S.; Liu, Y. Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Determines Interactions with Bovine Serum Albumin. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103* (March), 109856. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109856>.
- (40) Li, L.; Mu, Q.; Zhang, B.; Yan, B. Analytical Strategies for Detecting Nanoparticle-Protein Interactions. *Analyst* **2010**, *135* (7), 1519–1530. <https://doi.org/10.1039/c0an00075b>.
- (41) Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a Fluorescent Probe for Reactive Oxygen Species Measurement: Forty Years of Application and Controversy. *Free Radic. Res.* **2010**, *44* (6), 587–604. <https://doi.org/10.3109/10715761003709802>.
- (42) Brandt, R.; Keston, A. S. Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. *Anal. Biochem.* **1965**, *11* (1), 6–9. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90035-7).
- (43) Wilson, M. R.; Lightbody, J. H.; Donaldson, K.; Sales, J.; Stone, V. Interactions between Ultrafine Particles and Transition Metals in Vivo and in Vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2002**, *184* (3), 172–179. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9501>.
- (44) Patra, H. K.; Banerjee, S.; Chaudhuri, U.; Lahiri, P.; Dasgupta, A. K. Cell Selective Response to Gold Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2007**, *3* (2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.03.005>.
- (45) Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y. Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. *ACS Nano* **2010**, *4* (9), 5421–5429. <https://doi.org/10.1021/nn1010792>.
- (46) Porret, E.; Sancey, L.; Martín-Serrano, A.; Montañez, M. I.; Seeman,

- R.; Yahia-Ammar, A.; Okuno, H.; Gomez, F.; Ariza, A.; Hildebrandt, N.; Fleury, J. B.; Coll, J. L.; Le Guével, X. Hydrophobicity of Gold Nanoclusters Influences Their Interactions with Biological Barriers. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (17), 7497–7506. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02497>.
- (47) Cardoso, E.; Londero, E.; Ferreira, G. K.; Rezin, G. T.; Zanoni, E. T.; de Souza Notoya, F.; Leffa, D. D.; Damiani, A. P.; Daumann, F.; Rohr, P.; da Silva, L.; Andrade, V. M.; da Silva Paula, M. M. Gold Nanoparticles Induce DNA Damage in the Blood and Liver of Rats. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, *16* (11). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2727-1>.
- (48) Kuo, L. J.; Yang, L.-X. Gamma-H2AX - a Novel Biomarker for DNA Double-Strand Breaks. *In Vivo* **2008**, *22* (3), 305–309.
- (49) Vermes, I.; Haanen, C.; Reutelingsperger, C. Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death. *J. Immunol. Methods* **2000**, *243* (1–2), 167–190. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7).
- (50) Yu, C.; Zhou, M.; Zhang, X. X.; Wei, W.; Chen, X.; Zhang, X. X. Smart Doxorubicin Nanoparticles with High Drug Payload for Enhanced Chemotherapy against Drug Resistance and Cancer Diagnosis. *Nanoscale* **2015**, *7* (13), 5683–5690. <https://doi.org/10.1039/C5NR00290G>.
- (51) Gautier, J.; Allard-Vannier, E.; Munnier, E.; Soucé, M.; Chourpa, I. Recent Advances in Theranostic Nanocarriers of Doxorubicin Based on Iron Oxide and Gold Nanoparticles. *J. Control. Release* **2013**, *169* (1–2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.018>.
- (52) Ambrosone, A.; Pino, P. del; Marchesano, V.; Parak, W. J.; de la Fuente, J. M.; Tortiglione, C. Gold Nanoprisms for Photothermal Cell Ablation in Vivo. *Nanomedicine* **2014**, *9* (13), 1913–1922. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.100>.
- (53) Cihoric, N.; Tsikkinis, A.; Van Rhoon, G.; Crezee, H.; Aebbersold, D. M.; Bodis, S.; Beck, M.; Nadobny, J.; Budach, V.; Wust, P.; Ghadjar, P. Hyperthermia-Related Clinical Trials on Cancer Treatment within the ClinicalTrials.gov Registry. *Int. J. Hyperth.* **2015**, *31* (6), 609–614. <https://doi.org/10.3109/02656736.2015.1040471>.
- (54) Norouzi, H.; Khoshgard, K.; Akbarzadeh, F. In Vitro Outlook of Gold Nanoparticles in Photo-Thermal Therapy: A Literature Review. *Lasers Med. Sci.* **2018**, *33* (4), 917–926. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2467-z>.

# **Capítulo 4**

## **Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión**





# 1. INTRODUCCIÓN

La terapia fototérmica o PTT se ha explorado ampliamente en los últimos años ya que se trata de una técnica no invasiva, con bajo coste, efectos secundarios bajos y buen control espaciotemporal<sup>1</sup> a diferencia de tratamientos convencionales de tumores como la radioterapia, quimioterapia y cirugía, que presentan menor eficacia, alta probabilidad de reincidencia del cáncer y efectos secundarios severos.<sup>2</sup> El mecanismo de la PTT se basa en la conversión de fotones de energía electromagnética en calor mediante agentes fototérmicos (PTA).<sup>3</sup> Los PTA más utilizados están basados, en general, en materiales o moléculas orgánicas. Sin embargo, estos materiales presentan baja estabilidad y efecto *photobleaching*.<sup>4</sup> Las nanopartículas de oro son candidatas prometedoras como PTA debido a sus propiedades ópticas, fácil funcionalización y alta estabilidad.

Las notables propiedades ópticas de las nanopartículas de oro se caracterizan por el fenómeno de resonancia de plasmón localizado de superficie (LSPR) y la conversión eficiente de radiación electromagnética en calor (véase Capítulo 1).<sup>5</sup> Modificando el tamaño y la relación de aspecto de las nanopartículas es posible ajustar la posición de la banda de LSPR desde la región visible hasta el infrarrojo cercano (NIR). La absorbancia de los tejidos biológicos en la región NIR es considerablemente menor y se conoce como ventana biológica. (Figura 1).<sup>6</sup> Se puede dividir en tres regiones:

- La primera ventana biológica se observa en el rango de 650 a 950 nm que no es óptimo debido a la autofluorescencia del tejido.<sup>7</sup>
- La segunda ventana biológica es en el rango de 1000 y 1350 nm ofreciendo especial sensibilidad para imagen *in vivo*.<sup>8</sup>
- Finalmente, la tercera ventana biológica existe entre los rangos de longitud de onda entre 1500 y aproximadamente 1800 nm.

## Capítulo 4

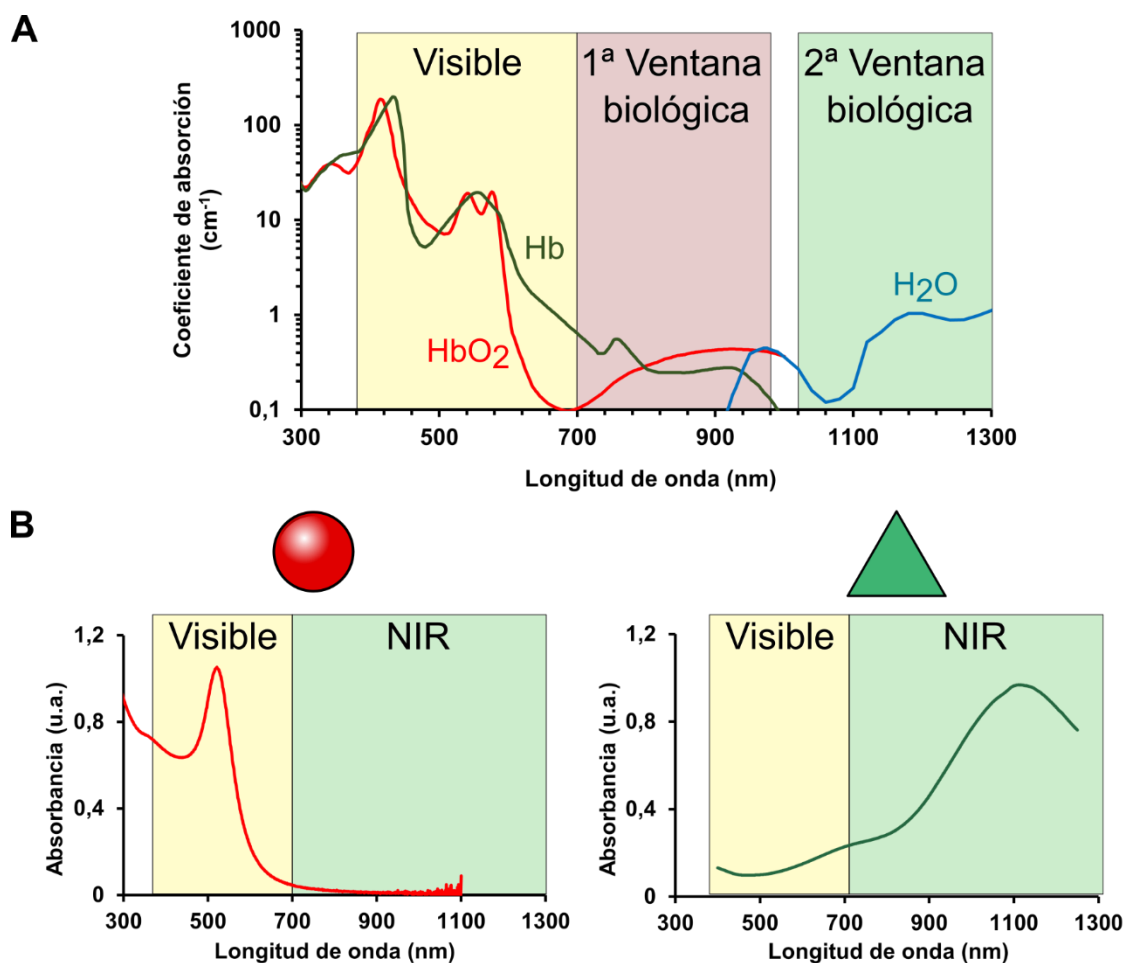


Figura 1. Propiedades ópticas de los componentes del tejido en el espectro de absorción visible hasta el infrarrojo cercano (NIR) donde se ha representado la absorción de la hemoglobina (Hb), oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) y el agua. Todos los espectros son datos compilados por Scott Prahl en Centro de Medicina Láser de Oregón (<http://omlc.ogi.edu/spectra/>). (A) Propiedades ópticas de nanoesferas (NSs) y nanoprismas (NPrs) obtenidas por un espectrofotómetro de UV-vis-NIR. (B) Figura adaptada de la ref 3.

Asimismo, el aumento de transparencia hacia la luz NIR en esos rangos de longitudes de onda permite una penetración más profunda en el tejido biológico y las nanopartículas de oro pueden absorber selectivamente la luz que penetra. Estos materiales permiten la concentración de calor en las zonas de interés, como tejido tumoral, evitando dañar las células sanas.<sup>9,10</sup> La forma de las nanopartículas juega un papel importante en el fenómeno de LSPR. En el caso de las nanoesferas de oro (NSs), la modificación del tamaño conlleva pequeños cambios en la posición de la banda de LSPR, en la región entre 500 y 600 nm.<sup>11</sup> Por esta razón, se prefiere usar nanoclusters

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

o formas anisótropas del oro como nanobastones (NRs),<sup>12</sup> nanoestrellas,<sup>13</sup> y nanoprismas (NPrs),<sup>14</sup> entre otros.

Además de las propiedades ópticas de las nanopartículas, la forma en que estas interactúan con las biomoléculas y la materia viva es decisiva para su aplicación en la terapia. En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación se compararon NRs y NPrs en varios aspectos: la capacidad para calentar medio de cultivo, el grado de internalización en células Vero y la capacidad de matar esas células mediante fototermia.<sup>15</sup> Para el trabajo se utilizaron NPrs y NRs cuyos LSPRs estaban cercanos a 1064 nm, la longitud de onda del láser de trabajo. Se observó que los NRs de oro son mejores transductores fototérmicos que los NPrs al producir un calentamiento mayor cuando se irradian muestras de nanopartículas con igual concentración de oro.<sup>16</sup> Sin embargo, los NPrs fueron más efectivos para inducir la muerte celular a través de la ablación fototérmica debido a su mayor internalización celular.<sup>15,17</sup> No obstante, la internalización celular superior de los NPrs de oro se debe a interacciones no específicas, por lo que en la aplicación *in vivo* cabría esperar que no se obtuviera selectividad en el tratamiento y que se produjeran daños innecesarios en el tejido local sano. El recubrimiento con polietilenglicol (PEG) como polímero antiadherente para evitar la internalización no específica no ha sido eficaz en el caso de NPrs de oro<sup>16-18</sup> y todavía no se ha descrito una alternativa mejor para NPrs de oro.

Los métodos de síntesis de NPrs de oro presentan mayor dificultad que la de sus homólogos isótropos y requieren la reacción de bajas concentraciones del precursor metálico, normalmente HAuCl<sub>4</sub>, con reductores débiles. Se utilizan diversos agentes de recubrimiento o plantillas, como polímeros o tensioactivos, para favorecer la selectividad de forma<sup>19,20</sup>. El enfoque más exitoso para NPrs de oro<sup>21-24</sup> implica el uso de tensioactivos

## Capítulo 4

como el bromuro o el cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAB), con los que se obtienen excelentes selectividades de tamaño y forma. Sin embargo, estos tensioactivos son citotóxicos, lo que supone una seria limitación para aplicaciones que involucren el contacto directo del material con tejidos sanos.<sup>25,26</sup> Por ejemplo, es un hecho conocido que diferentes líneas celulares son sensibles a CTAB. Cuando las células HT-29 (modelo de colon humano) se exponen a CTAB libre en una concentración de 200 nM durante 4 días, la viabilidad celular se reduce en un 50%.<sup>25</sup>

Para preparar NPRs de oro sin utilizar CTAB, generalmente, se emplean condiciones reductoras suaves en combinación con un agente director que puede ser otro tensioactivo, polímeros sintéticos<sup>27-32</sup> o naturales<sup>33</sup>, cristales líquidos<sup>34</sup> o haluros de metales alcalinos.<sup>35</sup> Con estos reactivos no se consigue una buena selectividad de forma ya que se obtienen nanopartículas esféricas como producto secundario. Es conveniente separar los NPRs de las nanopartículas esféricas. Las nanopartículas esféricas podrían conducir a una mayor respuesta inmune y un aumento de la toxicidad.<sup>12</sup> Asimismo, requieren valiosas moléculas activas o de vectorización cuando se requieren pasos de bioconjugación.

Los métodos descritos hasta la fecha para aislar NPRs de oro necesitan mucho tiempo y solo son asequibles a muy baja escala, lo que limita el número y la extensión de posteriores pruebas *in vivo*. La separación por diálisis para excluir determinados tamaños de nanomateriales solo permite separar tamaños de nanoesferas menores a 10 nm.<sup>36</sup> También se ha aprovechado la carga y tamaño de los materiales para separar las nanopartículas por electroforesis. Nuestro grupo aprovechó esta diferencia para separar pequeñas cantidades de NPRs de las NSs que se obtienen como subproducto en la síntesis (Figura 2, A). En ese método, las muestras se cargaban en los pocillos del gel de agarosa y se aplicaba la diferencia de

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

potencial durante 1 h. Las diferentes movilidades electroforéticas resultaban en la resolución de dos bandas en el gel de agarosa. La banda correspondiente a los NPRs (verde) se cortaba. Para poder eliminar la agarosa que contaminaba los NPRs ya libres de NSs, se utilizaba una filtración electroforética en TBE con una membrana de diálisis con corte en 10 kDa (100 V, 2 h).<sup>37</sup> Este método de purificación requería mucho tiempo y solo permitía la preparación de pequeñas cantidades de NPRs con bajo rendimiento.<sup>38,39</sup>

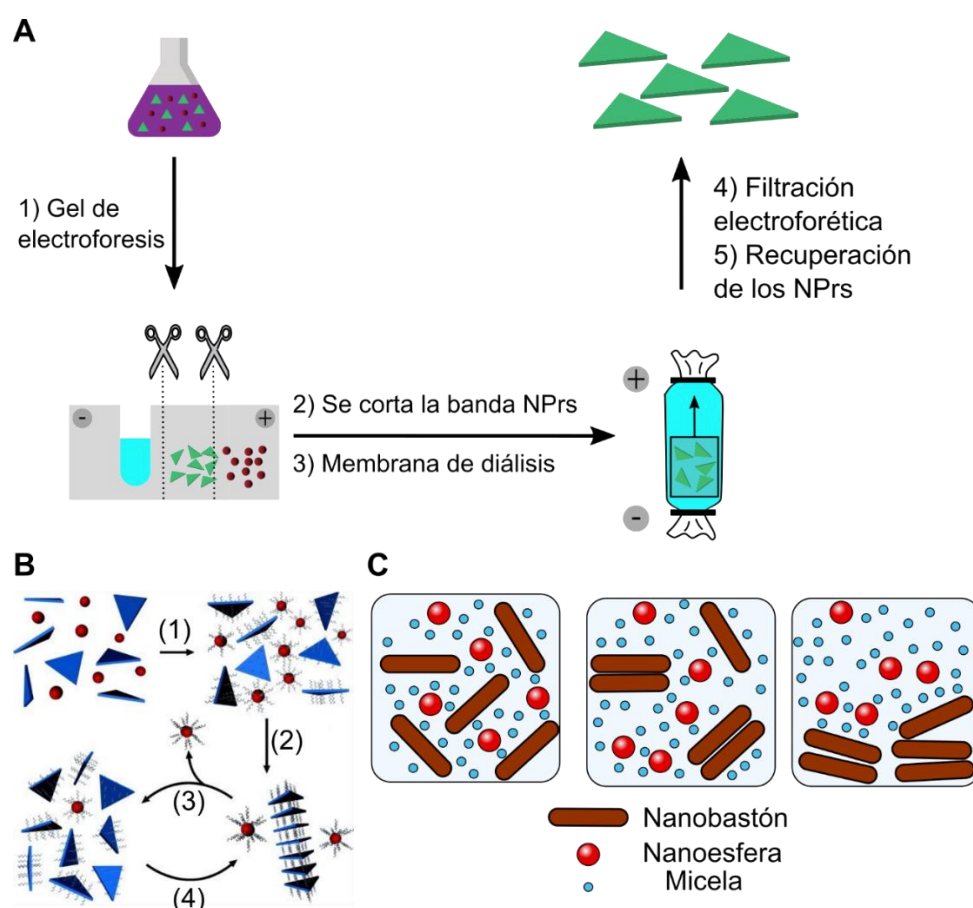


Figura 2. Ejemplos de purificación de nanopartículas. Purificación de nanoprismas de oro por electroforesis en gel: la disolución acuosa de nanoprismas y nanoesferas se carga en pocillos dentro de un gel de agarosa sumergido en una cubeta de electroforesis. Las NSs presentan diferente movilidad que los NPRs, y se forman dos bandas, una roja debida a las nanoesferas, y otra verde debida a los NPRs. Esta última se separa para recuperar los NPRs. (A)<sup>39</sup> Recristalización de nanoprismas funcionalizados con ADN, se divide en cuatro etapas: (1) Modificación con ADN, (2) cristalización selectiva de forma, (3) purificación, y (4) recristalización. (B)<sup>40</sup> Precipitación de nanobastones en presencia de nanoesferas

## Capítulo 4

debido a fuerzas de agotamiento (*depletion forces*) siguiendo el modelo de Askura y Oasawa. (C) <sup>41,42</sup>

Dentro de las estrategias que mayor éxito han tenido para la purificación de nanoprismas, destaca la recristalización mediante la hibridación de oligonucleótidos unidos a las nanopartículas. En el trabajo del grupo de Mirkin, la mezcla de nanoprismas y nanoesferas obtenida por un método mediado por semillas con CTAB se funcionalizó con cadenas de ADN. Por medio del control de la temperatura de hibridación de las cadenas, se precipitaron los NPRs, cuyas superficies planas facilitan la hibridación de más oligonucleótidos por nanopartícula (Figura 2, B).<sup>40</sup> El campo de aplicación de este método de purificación está sumamente restringido puesto que requiere de una funcionalización muy específica.

Asimismo, se ha trabajado en la precipitación selectiva por forma y tamaño, basándose en las diferentes interacciones de las nanopartículas debido a su superficie. Por ejemplo, con nanopartículas esféricas se genera mínimo contacto dada su geometría aproximadamente esférica. Ejemplos iniciales de esta metodología se encuentran en el trabajo de Park et al.<sup>41</sup> que demostraron que las nanopartículas en forma de bastones tienden a agregar y sedimentar en presencia de micelas, siendo esta agregación reversible (Figura 2, C). La concentración del surfactante juega un papel crítico en este método. Posteriormente, esta metodología se ha extendido a la purificación de NPRs en presencia de micelas de CTAC.<sup>43</sup> Otros ejemplos más recientes son los que utilizan fosfolípidos junto a otros surfactantes como sulfosuccinato de sodio y dioctilo (AOT) en lugar de CTAB.<sup>32</sup>

Los métodos de purificación por precipitación presentados dependen de la presencia de surfactante. Sería conveniente eliminar dicho surfactante de las síntesis para disminuir la complejidad del material y facilitar su uso en aplicaciones biomédicas enfocadas al tratamiento. Por ello, se plantea el uso de moléculas presentes en medio biológico como el glutatión, que es la

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

especie tiolada más abundante en la célula con una concentración intracelular de 1-10 mM.<sup>44</sup> El glutatión (GSH) y la cisteína han demostrado promover interacciones electrostáticas entre nanopartículas. En la literatura,<sup>45,46</sup> estas interacciones se explican por la forma zwitteriónica del GSH, lo que permite el autoensamblado de nanobastones por sus extremos tras la funcionalización selectiva con GSH (Figura 3). Dada la especial característica de la superficie de los NPRs comparado con otros tipos de nanopartículas, nuestra hipótesis es que las interacciones de GSH podrían utilizarse para purificar NPRs de otras formas de NP que pueden surgir de la síntesis como subproductos.

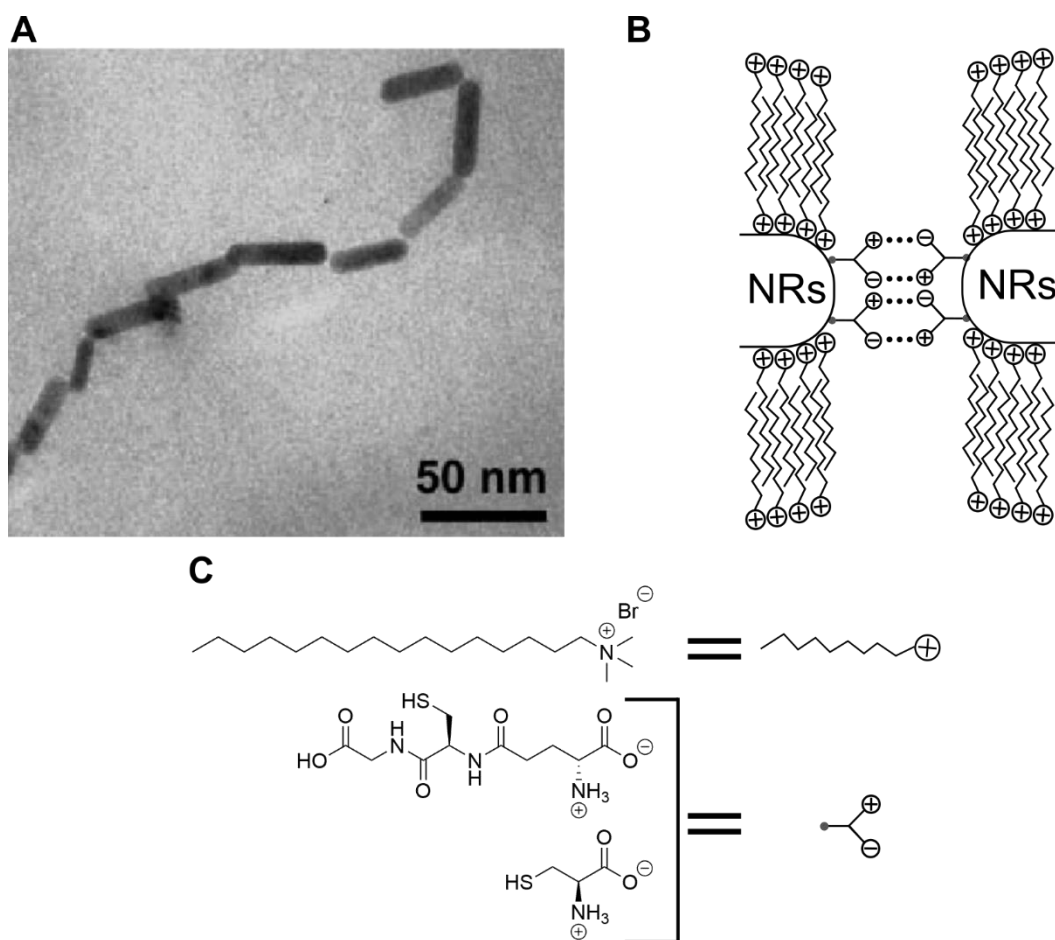


Figura 3. Imagen de TEM de nanobastones ensamblados formando una cadena (A), Esquema del mecanismo de ensamblaje (B) y estructuras moleculares de glutatión, cisteína y CTAB (C). Adaptado de la ref 46.

## Capítulo 4

Siguiendo ese planteamiento, en este capítulo presentamos un método de separación escalable basado en la precipitación cuantitativa y selectiva de NPrs de oro después de una síntesis sin el uso de surfactantes tales como el CTAB. El tratamiento del crudo de reacción con GSH promovería las interacciones entre nanopartículas, más importantes en NPrs que en NSs debido a la mayor superficie plana de NPrs, favoreciendo a su vez las interacciones múltiples.<sup>19</sup> Asimismo, presentaremos en este capítulo una mejora escalable de la purificación de NPrs mediante electroforesis en gel de agarosa comparándolo con el método de la precipitación selectiva mediada por GSH. Por último, la introducción de GSH en la superficie, que además tiene grupos ácidos y básicos, podría modificar la interacción que tiene este material con los componentes biológicos. Los materiales preparados se probarán en *in vitro* para la aplicación de estas nanopartículas en terapia fototérmica.



## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.1. Métodos de purificación de nanoprismas**

En este trabajo aplicamos los métodos de síntesis de nanoprismas (NPrs) de dos tamaños correspondientes a bandas LSPR centradas en 900 (P-NPrs) y 1100 nm (M-NPrs) que se optimizaron en el Capítulo 2. En el método establecido previamente por el grupo, esta mezcla se trataba con un polietilenglicol heterobifuncional, HS-PEG-COOH (5 kDa), para lograr una mejor estabilidad coloidal como paso previo a la separación de formas.<sup>37</sup> En el grupo de investigación, hemos utilizado métodos de separación que dependen de las propiedades de los materiales como el tamaño y la estabilidad coloidal. Mediante varios lavados con centrifugación usando bajas revoluciones, los NPrs estabilizados con PEG (NPrs-PEG) se separan de las NSs debido a la diferencia de tamaño de las nanopartículas. Este método se mejora, bien por separación electroforética de las nanopartículas, bien sencillamente por sedimentación lográndose que los NPrs-PEG decanten debido a su menor estabilidad coloidal comparada con la de las NSs. Sin embargo, ambos métodos producen bajo rendimiento de material.

#### **2.1.1. Purificación de nanoprismas por filtración electroforética**

Tal como se comentó en la introducción, los NPrs y NSs en M-NPr/NS son muy diferentes en tamaño y forma, por lo que se pueden separar por su diferente movilidad electroforética en geles de agarosa (Figura 2 A). Sin embargo, el método solo es accesible para bajas cantidades de material.<sup>38,39</sup> Para reducir la pérdida de NPs al recuperar los NPrs del gel, se plantea cambiar el enfoque y desarrollar un método en gel de agarosa, pero más parecido a una filtración. Debido a las diferencias de movilidad electroforética y el bajo diámetro hidrodinámico de las NSs en comparación

## Capítulo 4

a los NPrs, se ajusta el porcentaje de gel y tiempo de ejecución. A una alta concentración de gel (2,5 % en peso) se consigue que las nanoesferas entren en el gel, y los nanoprismas se queden en el pocillo. Al final del experimento, los nanoprismas se recuperan del pocillo y se resuspenden (Figura 4).

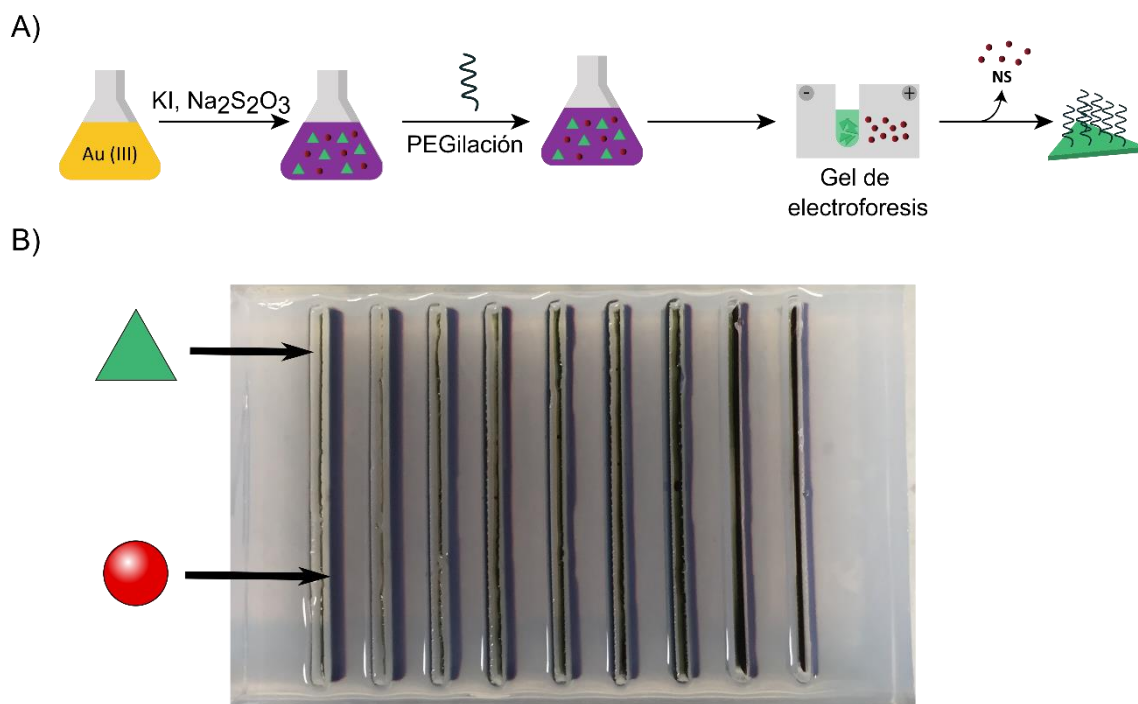


Figura 4. Método de síntesis de los nanoprismas y posterior purificación por filtración electroforética (A). La disolución acuosa de nanoprismas y nanoesferas estabilizadas con PEG se carga en pocillos dentro de un gel de agarosa (2.5%) sumergido en una cubeta de electroforesis llena de TBE 0.5x. Debido a la mayor movilidad electroforética y al menor diámetro hidrodinámico de los NS en comparación con los NPr, las nanoesferas entran en el gel y los nanoprismas se quedan en los pocillos. Al final del experimento, los nanoprismas se recuperaron de los pocillos. (B)

Se consigue mejorar de cuatro formas el método anterior de purificación por electroforesis en gel de agarosa. Primero, se trata de una filtración en la que la separación se produce en la entrada en el gel de agarosa, sin necesidad de esperar a que ambas bandas se resuelvan. Segundo, al no necesitar la resolución de las bandas en el gel de agarosa por tratarse de una filtración se puede cargar una mezcla más concentrada. Tercero,

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

puesto que la separación tiene lugar en la entrada al gel de agarosa se necesita menos longitud del gel para una misma cantidad de muestra por lo que en un mismo gel de agarosa estándar se pueden realizar varias filtraciones simultáneamente. Por último, los NPrs no llegan a penetrar en el gel por lo que se obtienen prácticamente libres de residuos de agarosa y se puede prescindir de la filtración electroforética con membrana de diálisis que se empleaba para eliminarlos. Estas mejoras se traducen en un aumento notable en la velocidad de trabajo (*throughput*): el nuevo método permite la purificación de 3 mg de NPrs por gel, requiriendo un tiempo total de 19 min, comparado con alrededor de 0,3 mg NPrs por gel que se podía preparar en más de 3 horas de experimento.<sup>37</sup>

La Figura 5 muestra los espectros UV-vis-NIR de las mezclas P-NPr/NS-PEG y M-NPr/NS-PEG obtenidas, en los cuales se pueden observar dos clases de bandas de absorción. Una banda en el espectro visible (530-535 nm) corresponde al LSPR de las NS, mientras que una segunda banda, más intensa centrada en 898 nm (P-NPr/NS-PEG) o 1076 nm (M-NPr/NS-PEG), corresponde al modo dipolar en el plano de los nanoprismas (Figura 5). Por un lado, el espectro UV-vis-NIR de los NPrs obtenidos P-NPr-PEG y M-NPr-PEG mostraba una supresión de la banda LSPR a 528 nm debida a las NSs. Por otro lado, se produjo un desplazamiento al infrarrojo para ambos P-NPrs-PEG y M-NPrs-PEG comparado con la situación inicial (Figura 5). Este desplazamiento puede deberse al aumento de tamaño medio después de la purificación como resultado de que los NPrs más pequeños entren en el gel y sean descartados.

## Capítulo 4

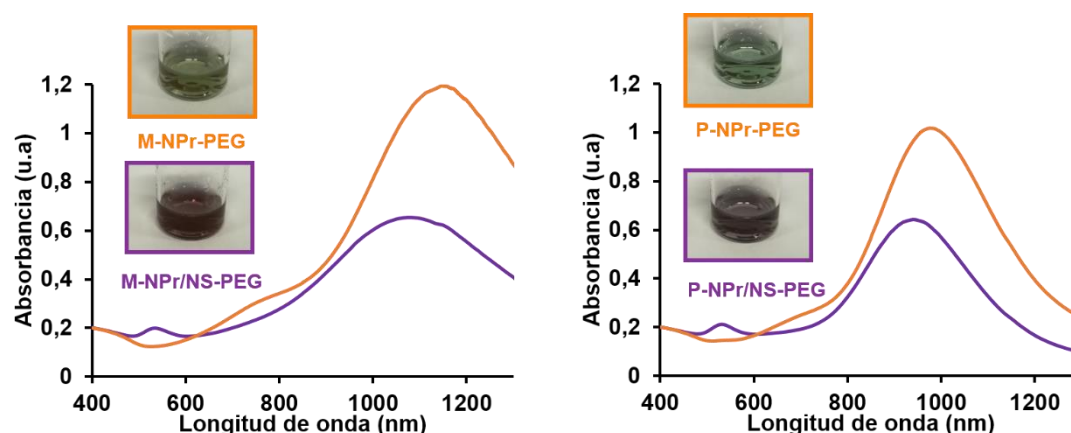


Figura 5. Espectro de absorción UV-Vis-NIR e imágenes de los M-NPrs (izquierda) y P-NPrs (derecha). Código de color: NPr/NS-PEG (—) y NPr-PEG (—).

### 2.1.2. Purificación de nanoprismas con glutatión (GSH)

Los NPrs tienden a sedimentar después de varias semanas en contraste con las NS que son coloidalmente más estables, dando lugar a NPrs enriquecidos en un tamaño mayor que la mezcla sintetizada.<sup>16</sup> Este proceso se puede acelerar por centrifugación o desestabilización con el empleo de disolventes que desestabilicen la suspensión coloidal. Sin embargo, este procedimiento no suele presentar buenos rendimientos.

Nuestra hipótesis para este trabajo fue que interacciones interpartículas específicas permitirían un método de purificación más sencillo y rápido basado en la precipitación selectiva. Se ha descrito que el glutatión y la cisteína desplazan selectivamente las moléculas de CTAB de los extremos de las puntas de nanobastones debido a un empaquetamiento menos denso del tensioactivo en los extremos de la nanopartícula. El grupo de Gao postuló que los grupos de cabeza del surfactante prefieren un mayor espacio de los átomos de oro en las zonas laterales de los nanobastones, que presentan caras [100] en vez de los extremos.<sup>47</sup>

La unión selectiva de cisteína y glutatión en los extremos de las puntas de los NRs condujo a ensamblajes lineales de varillas y esferas con las

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

varillas conectadas de extremo a extremo a un pH bajo ( $\text{pH} \sim 4$ ),<sup>46</sup> que se atribuye a la interacción entre las formas zwitteriónicas de cisteínas o glutatión en diferentes partículas a ese pH. Basándonos en esos trabajos, planteamos la hipótesis de que tales interacciones entre partículas serían más importantes en NPRs que en NSs, ya que las grandes superficies planas de NPR permitirían interacciones multipuntuales. Al ser interacciones dependientes del pH, se podría controlar el grado de agregación o precipitación ajustando el pH (Figura 6).

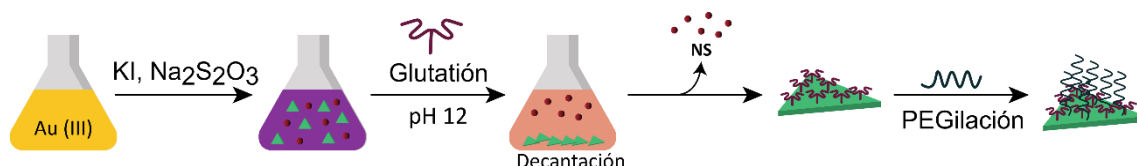


Figura 6. Método propuesto para la purificación de los nanoprismas de oro (NPRs) de una mezcla con nanoesferas de oro (NSs).

Los M-NPr/NS se prepararon utilizando la metodología optimizada en capítulos anteriores. Tratamos la mezcla de síntesis de nanoesferas y nanoprismas (M-NPr/NS) con GSH a diferentes pH para promover la interacción entre partículas (Figura 6). El crudo de la reacción M-NPr/NS tiene pH 3 como resultado del uso de ácido tetracloroáurico como material de partida. La adición de GSH a ese pH provoca la agregación rápida e irreversible de las nanopartículas, produciendo un oscurecimiento del color violeta de la disolución y la posterior precipitación de las nanopartículas en suspensión. Cuando la adición de GSH se realiza a pH superiores, por encima del  $\text{pK}_a$  de los grupos carboxilo y del punto isoeléctrico del glutatión, los nanoprismas precipitan lentamente y de la mezcla se separa un precipitado verde quedando el sobrenadante rojo violáceo. Este hecho nos confirma que la precipitación selectiva de los nanoprismas (verdes) estaba teniendo lugar quedando en el sobrenadante las nanoesferas (rojizas). A pH 12 la

## Capítulo 4

precipitación ocurre con un alto rendimiento comparado con la precipitación a pH 6 y 8 para la misma cantidad de GSH y este pH fue seleccionado para la precipitación. El sedimento verde, formado por los NPrs funcionalizados con GSH (M-NPr-GSH) se redispersa fácilmente en agua.

Cuando se usan las condiciones optimizadas a pH 12, el espectro UV-Vis-NIR de los NPrs-GSH (Figura 7) muestra la desaparición de la banda de LSPR de las NS a 530 nm y por lo tanto la eficacia para eliminar las NS de la mezcla. Por otro lado, la banda de LSPR en la región NIR desaparece completamente en el sobrenadante indicando que no hay una pérdida significativa de nanoprismas durante la purificación (Figura 7).

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

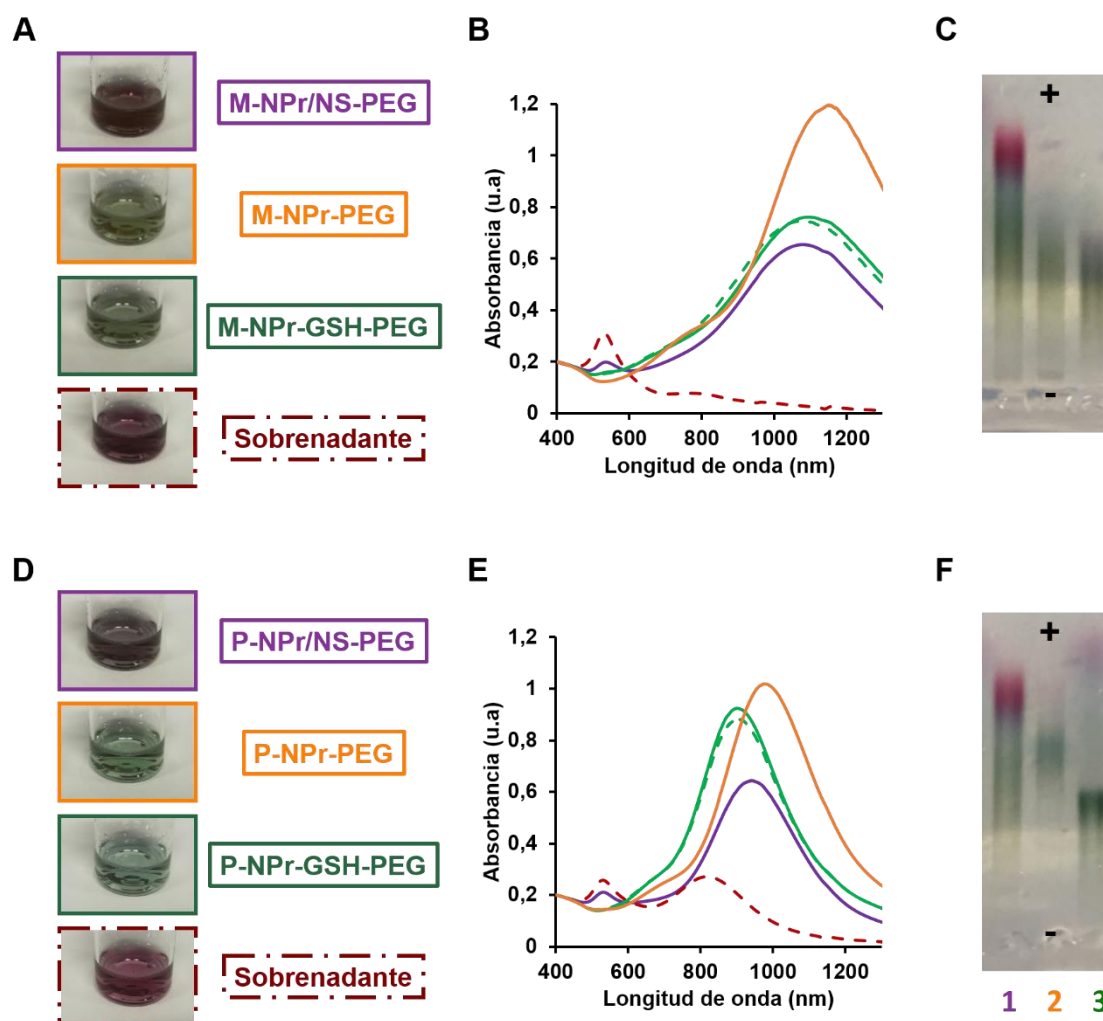


Figura 7. (A) y (D) Aspecto de las disoluciones de NPrs preparados. (B) y (E) Espectro de absorción UV-Vis-NIR NPrs preparados con la banda LSPR alrededor de 1100 nm y 900 nm. (C) y (F) Gel de electroforesis comparativo entre las tres muestras. (A), (B) y (C) correspondiente a los NPrs con la banda LSPR alrededor de 1100 nm y, (D), (E) y (F) corresponde a 900 nm. Código de color: NPr/NS-PEG (—), NPr-GSH (—), NPr-GSH-PEG (—), NPr-PEG (—) y sobrenadante (—).

M-NPr-GSH son coloidalmente estables en agua con respecto al tiempo. Sin embargo, el uso de diversos tampones como fosfato de sodio provoca la agregación de estas nanopartículas cuando no hay exceso de GSH en la disolución, probablemente como consecuencia del apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre nanopartículas y del desplazamiento de parte del GSH por iones fosfatos, más pequeños.

## Capítulo 4

Por esta razón, fue necesario un paso de PEGilación para incrementar la estabilidad de los nanoprismas y facilitar una posterior bioconjugación (Figura 6). Para este paso se utilizaron las mismas condiciones de pH básico y exceso de PEG que teníamos establecidas para la PEGilación de la mezcla resultante de la síntesis. Se trata de condiciones de gran exceso de PEG, aunque en este sistema no podemos determinar si el PEG tiolado es capaz de desplazar moléculas de glutatión de la superficie de los nanoprismas. Nuestra hipótesis es que después de la PEGilación el recubrimiento consiste en moléculas de PEG en conformación champiñón con moléculas de GSH, más pequeñas, que quedan en los huecos dejados por el PEG en ciertas conformaciones promoviendo un recubrimiento más eficiente. Sin embargo, la presencia simultánea de PEG y GSH imposibilitó la cuantificación de cualquiera de ellos tanto en términos absolutos como relativos. Después de la PEGilación no hay cambios significativos en el espectro UV-Vis-NIR.

En la literatura, los rendimientos de síntesis de los NPrs se obtienen a partir de las medidas de espectros de absorción. Por el contrario, nosotros determinamos el rendimiento por un método más exacto como el ICP-AES en varias síntesis usando una escala de 80 mg mediante el protocolo libre de CTAB y nuestra precipitación mediada por GSH o gel de electroforesis. Los rendimientos obtenidos (Tabla 1, Entrada 1) fueron comparables con el rendimiento total de (NPrs + NSs) obtenido con otros métodos sintéticos.<sup>36</sup> Por un lado, los NPrs pueden recuperarse casi completamente después del paso de PEGilación obteniendo un  $38 \pm 7\%$  en el caso del empleo de GSH (Tabla 1, Entrada 4). Por otro lado, la purificación de los NPrs sin el empleo de GSH mediante gel de electroforesis (M-NPrs-PEG) fue de  $19 \pm 3\%$ . De esta manera, se ha conseguido doblar el rendimiento de la purificación comparada con la purificación por filtración en gel de agarosa. Cabe destacar que también se ha producido una reducción y una simplificación del



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

protocolo de trabajo: normalmente la purificación filtración electroforética en gel requiere una 6 h de trabajo para la misma escala de trabajo.

**Tabla 1.** Comparación de la  $\lambda_{\text{LSPR}}$ , rendimiento y tamaño de los NPrs preparados por los dos métodos.

Ent.	Material	$\lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)	Rendimiento <sup>2,3</sup> (%)	Longitud del borde (nm)
1	M-NPr/NS-PEG	1076	66 ± 4	131 ± 37
2	M-NPr-PEG	1149	19 ± 3	205 ± 41
3	M-NPr-GSH	1078	42 ± 7	188 ± 57
4	M-NPr-GSH-PEG	1092	38 ± 7	165 ± 45
5	P-NPr/NS-PEG	898	48	110 ± 31
6	P-NPr-PEG	940	13	125 ± 24
7	P-NPr-GSH	818	24	
8	P-NPr-GSH-PEG	901	21	121 ± 19

<sup>1</sup>Resultados de Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES); <sup>2</sup>Porcentaje de oro basado en la inicial de oro (III) añadida en la síntesis y extrayendo el resultado de cuatro síntesis para la síntesis de M-NPrs. <sup>3</sup>Para P-NPrs no se hicieron réplicas.

Se puede utilizar la deposición mediada por GSH para la preparación de NPrs de otros tamaños. Cuando este protocolo se aplica para la síntesis de NPrs de longitud de borde de 120 nm con la banda LSPR alrededor de 900 nm (P-NPrs) la deposición es menos efectiva y es necesario un aumento de la cantidad de GSH que se añade. Se obtiene un 24% del rendimiento de oro en la precipitación (Tabla 1, Entrada 7). El espectro de absorción UV-Vis del sobrenadante mostró una banda de LSPR a 528 nm correspondiente a los NS, así como un máximo débil a 815 nm atribuido a los P-NPrs, lo que indica que hay una pérdida de rendimiento en el proceso (Figura 7, E). Sin embargo, el rendimiento global del 21% representa una mejora notable respecto al 13% obtenido usando la purificación por filtración electroforética en gel de agarosa (Tabla 1, Entrada 8).

## Capítulo 4

Tomados en conjunto, tanto la precipitación selectiva mediada por GSH como la filtración en gel de agarosa condujeron a la aparente separación completa de los NS por UV-vis-NIR (Figura 7, B). Sin embargo, se obtuvo un rendimiento dos veces mayor cuando se usó el primero. Además, la precipitación mediada por GSH es más susceptible de aumento de escala que la filtración electroforética, principalmente porque elimina la necesidad de instrumentación costosa y mano de obra.<sup>48</sup>

### 2.2. Caracterización de los nanoprismas tras la purificación

Caracterizamos los materiales obtenidos mediante los métodos de purificación para demostrar que no presentan grandes diferencias entre ellos. A priori, ambos métodos podrían causar el enriquecimiento en NPrs de mayor tamaño, lo que tendría un efecto en el espectro UV-vis-NIR. Sin embargo, la deposición selectiva no conduce a un cambio significativo en el LSPR (Figura 7). La misma banda aparece desplazada a mayores longitudes de onda para M-NPr-PEG, lo que indica que el rendimiento más bajo con ese método podría ser causado por la exclusión de tamaño de NPrs más pequeños. Se observan diferencias similares para los P-NPrs (Figura 7).

En este trabajo usamos la microscopía electrónica de barrido (SEM) para verificar que esta metodología no altera la distribución del tamaño ni la morfología de los NPrs (Figura 8). Por un lado, las muestras de M-NPr/NS-PEG contenían una gran cantidad de NS, independientemente de la baja intensidad del LSPR correspondiente (Figura 7, B). Por otro lado, la selectividad de la deposición mediada por GSH se demuestra mediante imágenes SEM en las que apenas se pueden detectar NS (Figura 8, B). Solo aparece un aumento moderado en la dimensión de los NPrs, pasando a ser de  $165 \pm 45$  nm de longitud de borde para M-NPr-GSH-PEG (Figura 8, B y E).

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

Sin embargo, las muestras de M-NPr-PEG muestran dimensiones significativamente mayores,  $205 \pm 43$  nm (Figura 8, C y F), tal y como era de esperar teniendo en cuenta los espectros UV-Vis-NIR (Figura 7, B). El menor rendimiento de la electroforesis en gel es evidente debido a que solo se purifican los nanoprismas de mayor tamaño. Cabe destacar que ninguno de los dos métodos puede separar otras formas anisótropas producidas durante esta síntesis, donde aproximadamente el 10% corresponde a hexágonos y otras formas de nanoplatos.

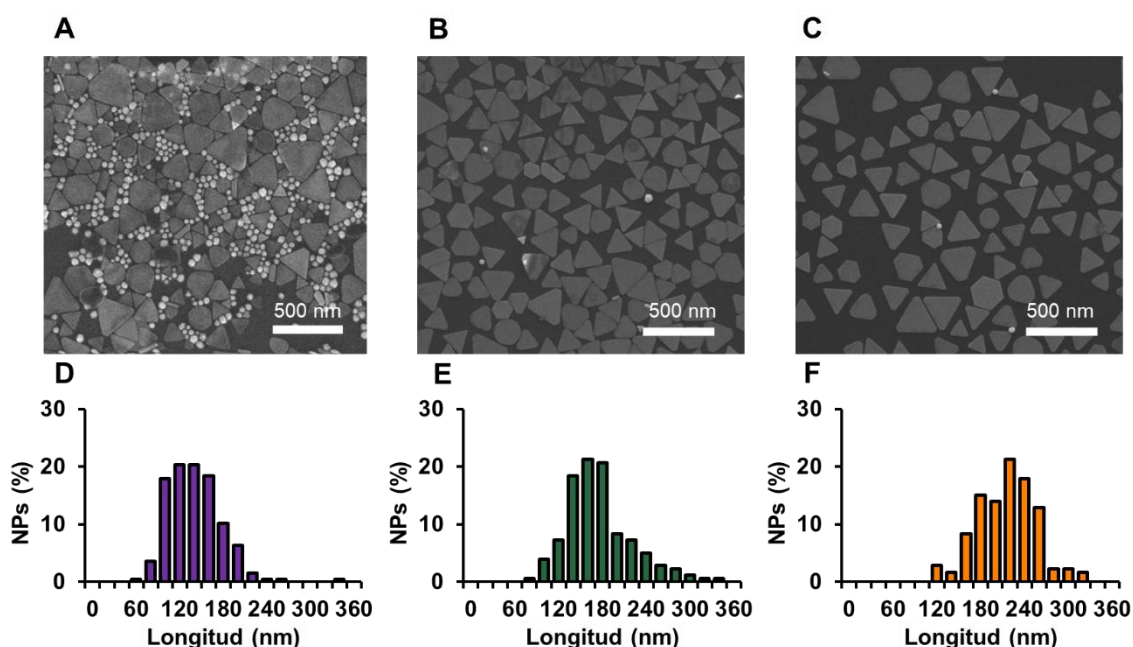


Figura 8. (A–C) Microscopía electrónica de barrido (SEM) micrografía correspondiente a M-NPr/NS-PEG, M-NPr-GSH-PEG, y M-NPr-PEG, respectivamente. (D–F) Histogramas correspondientes a los nanoprismas preparados: M-NPr/NS, M-NPr-GSH-PEG, y M-NPr-PEG, respectivamente. Las nanoesferas no se tuvieron en cuenta para los histogramas.

Con respecto a los P-NPrs, también se observa la presencia de esferas tras la síntesis, P-NPr/NS-PEG (Figura 9, A). Tras la purificación por ambos métodos, el tamaño de los NPrs aumenta hasta 125 nm. No obstante, P-NPr-PEG se purifican peor y se observan algunas esferas en las imágenes de

## Capítulo 4

SEM, aunque la contribución de las NSs en el UV-vis desaparece. Para retirar las nanoesferas se podría hacer otro gel de electroforesis, pero descartamos esta opción ya que disminuiría el rendimiento, ya de por sí bajo.

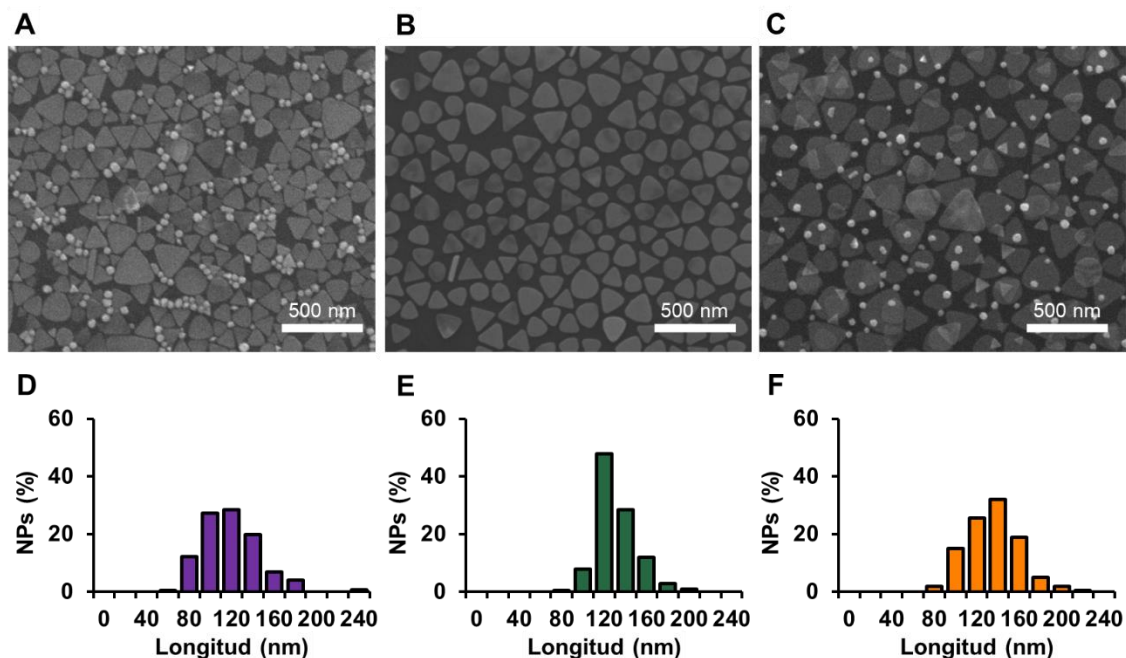


Figura 9. (A–C) Microscopía electrónica de barrido (SEM) micrografía correspondiente a P-NPr/NS-PEG, P-NPr-GSH-PEG, y P-NPr-PEG, respectivamente. (D–F) Histogramas correspondientes a los nanoprismas preparados: P-NPr/NS, P-NPr-GSH-PEG, y P-NPr-PEG, respectivamente. Las nanoesferas no se tuvieron en cuenta para los histogramas.

Una vez realizada la caracterización física de todas las nanopartículas, decidimos centrarnos en los M-NPrs-PEG y M-NPrs-GSH-PEG debido a que presentan el mayor rendimiento y la aplicación se centra en irradiar a una longitud de onda de 1060 nm, más cercana a banda de LSPR de estos materiales. Antes de probar estos materiales para aplicaciones biomédicas es importante conocer su estabilidad coloidal en condiciones relevantes para medios biológicos. La estabilidad coloidal, junto a la reactividad superficial y la capacidad de establecer interacciones no específicas con proteínas en medios biológicos, son aspectos esenciales para las futuras aplicaciones biotecnológicas.

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

Todas las partículas dan suspensiones coloidales estables en agua a pesar de sus bajos valores absolutos de potencial- $\zeta$ . M-NPrs-PEG y M-NPrs-GSH-PEG exhiben valores similares,  $-13,9 \pm 0,5$  mV y  $-15,9 \pm 0,8$  mV, respectivamente, lo que indica un recubrimiento eficiente con PEG a pesar de la presencia de GSH. Por otro lado, M-NPr-GSH exhibe un valor absoluto más alto  $-23,0 \pm 1,0$  mV.

La estabilidad coloidal de los M-NPrs-GSH-PEG es levemente superior a la de nuestro estándar M-NPr-PEG en condiciones idénticas. La Figura 10 muestra la variación con el tiempo de la absorbancia en la banda LSPR de las muestras dispersas en tampón fosfato (20 mM) en el rango de pH 3-12 así como en una disolución acuosa de NaCl (1 M). M-NPrs-PEG son completamente estables en agua a temperatura ambiente, pero se agregan a un pH por debajo del pKa de los grupos carboxilos (pH 3). La temperatura y las disoluciones de fosfato básicas causan la agregación gradual de los NPrs después de unos días (Figura 10, B). Curiosamente, M-NPrs-GSH-PEG presenta una mayor estabilidad. Después de 12 días, solo la mitad de la absorbancia se había perdido en NaCl y tampones fosfatos pH 9 y 12 (Figura 10, A).

## Capítulo 4

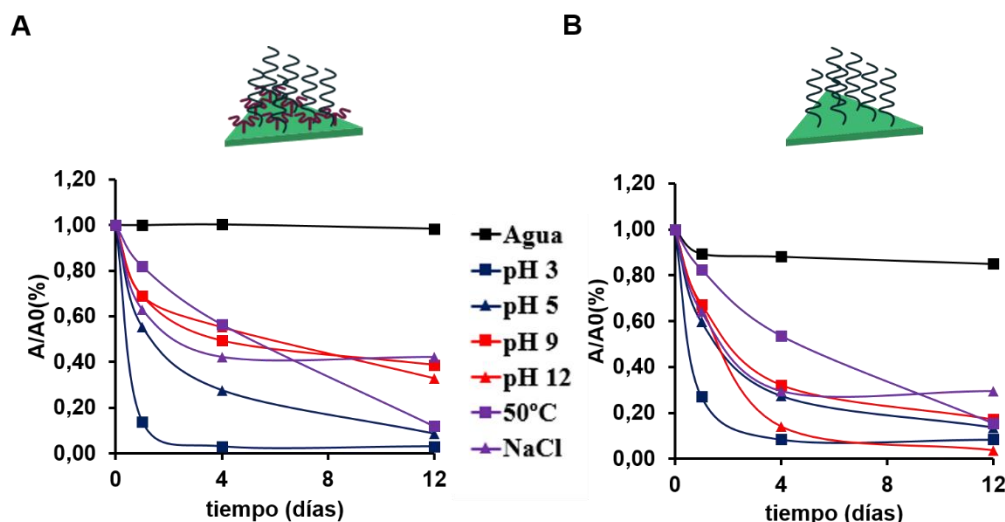


Figura 10. Prueba de estabilidad coloidal aplicada a M-NPrs-GSH-PEG (A) y M-NPrs-PEG (B) dispersados en agua a temperatura ambiente y 50 °C, en tampón fosfato (20 mM) a temperatura ambiente en el rango de pH de 3 a 12 y en presencia de NaCl 1 M. La absorbancia relativa al valor inicial se representa frente al tiempo para todas las muestras.

Junto a las sales, las proteínas son uno de los mayores componentes de los fluidos biológicos. En el Capítulo 3, se introdujo el término de la corona de proteínas, que es la capa de biomoléculas, principalmente proteínas, que se forma en torno a las nanopartículas cuando entran en contacto con el medio biológico.<sup>49</sup> En dicho capítulo, se estudiaron las interacciones de nanoesferas estabilizadas con PEG458 (NS-PEG458) con la albúmina de suero bovino (BSA), que es la proteína plasmática más abundante en humanos y otros mamíferos. Se concluyó que estas nanopartículas no producían un cambio drástico en la estructura secundaria de la proteína y estos resultados concordaban con estudios previos de la bibliografía.<sup>50</sup> Sin embargo, no se determinó la cantidad de proteína que se unía a la nanopartícula.

Para evaluar las interacciones de NPRs con proteínas, se incubó albúmina de suero bovino (BSA; 66,5 kDa; pI 4,7) con los NPRs a pH fisiológico y se monitoriza la estabilidad coloidal de las partículas. Las nanopartículas permanecen estables, pero no se registra adsorción de

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

proteínas por ensayo colorimétrico de Bradford a pH superiores a 5. La BSA interactúa con NPRs a pH por debajo del punto isoelectrico, en el cual la carga neta de BSA es neutra y no hay repulsiones electrostáticas con los grupos carboxilos en el recubrimiento de las nanopartículas aún cargadas negativamente a ese pH.

Con el fin de detectar cambios muy sutiles en la adsorción de proteínas en los diferentes materiales, se decide usar radiomarcaje para la cuantificación de emisiones gamma. La BSA se marca con  $^{125}\text{I}$  y la BSA se adsorbe en los materiales a pH 4,7. Luego se evalúa la estabilidad de la corona de proteínas en M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-PEG en tres condiciones de pH diferentes (Tabla 2). Para una comparación más equilibrada representamos la proteína adsorbida por  $\text{nm}^2$  de área superficial, para lo que utilizamos concentraciones de Au obtenidas de ICP-AES (o UV Vis), y las dimensiones de las nanopartículas obtenidas mediante SEM. Cualitativamente, ambos materiales muestran la misma tendencia: la corona de proteína BSA es más estable a pH ácido que a pH neutro y básico, para el cual la mitad de la proteína se libera después de dos ciclos de lavado. M-NPrs-GSH-PEG presenta prácticamente la misma relación de adsorción en comparación con el M-NPrs-PEG en todas las condiciones de pH probadas, lo que puede deberse a que ambos materiales presentan un recubrimiento similar en la superficie.

## Capítulo 4

Tabla 2. Resultados de los estudios de adsorción y desorción de los NPrs con BSA.

Ent.	NPs	pH	BSA/nm <sup>2</sup> ·10 <sup>3</sup>
1	M-NPrs-GSH-PEG	4,7 <sup>a</sup>	6,32
2		7 <sup>b</sup>	2,90
3		9 <sup>c</sup>	3,18
4	M-NPrs-PEG	4,7 <sup>a</sup>	5,55
5		7 <sup>b</sup>	3,48
6		9 <sup>c</sup>	3,21

<sup>a</sup> Tampón acetato de sodio 20 mM; <sup>b</sup> Tampón HEPES 20 mM, <sup>c</sup> Tampón borato de sodio 20 mM.

### 2.3. Estudios *in vitro* de los nanoprismas en células adherentes

#### 2.3.1. Citotoxicidad e internalización de los M-NPrs-GSH-PEG vs M-NPrs-PEG en células

Al evaluar estas partículas para aplicaciones biotecnológicas se debe atender su citotoxicidad y absorción celular. Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de oro como la forma, el tamaño, y la carga son factores críticos para la interacción con los componentes biológicos, y podrían influir en el mecanismo de internalización de estos materiales.<sup>51</sup> En principio, la interacción del medio extracelular y la membrana con los nanoprismas de oro, M-NPrs-GSH-PEG o M-NPrs-PEG, debería ser equivalente puesto que forma, tamaño y recubrimiento son esencialmente iguales para ambos tipos de materiales. Sin embargo, la presencia de GSH en M-NPrs-GSH-PEG podría modificar la densidad del recubrimiento de PEG y la conformación de las moléculas de PEG con respecto a M-NPrs-PEG.

En primer lugar, se evalúa la toxicidad de los NPrs mediante un ensayo de viabilidad celular siguiendo el procedimiento de trabajos anteriores.<sup>16</sup> Se determina la viabilidad de las células por ensayo MTT. A diferencia del



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

MTS, la reducción del compuesto de tetrazolio MTT genera una sal de formazán insoluble en agua (véase Capítulo 3). Los cristales de formazán se solubilizan con DMSO.

En el ensayo se utilizan células Vero (célula epitelial de riñón extraída de un mono verde africano) como modelo de célula de mamíferos con diferentes concentraciones de AuNPrs hasta  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Tras 24 h de incubación con las nanopartículas, las células Vero se incuban con el reactivo de MTT y se determina que, en el rango de concentraciones estudiado, la viabilidad de las células se mantiene por encima del 85% (Figura 11). La normativa ISO 10993-5 establece un límite de viabilidad del 70% para considerar el fármaco como tóxico a una determinada concentración. De acuerdo con esta normativa, las NPs no son tóxicas en el rango de concentraciones estudiado.

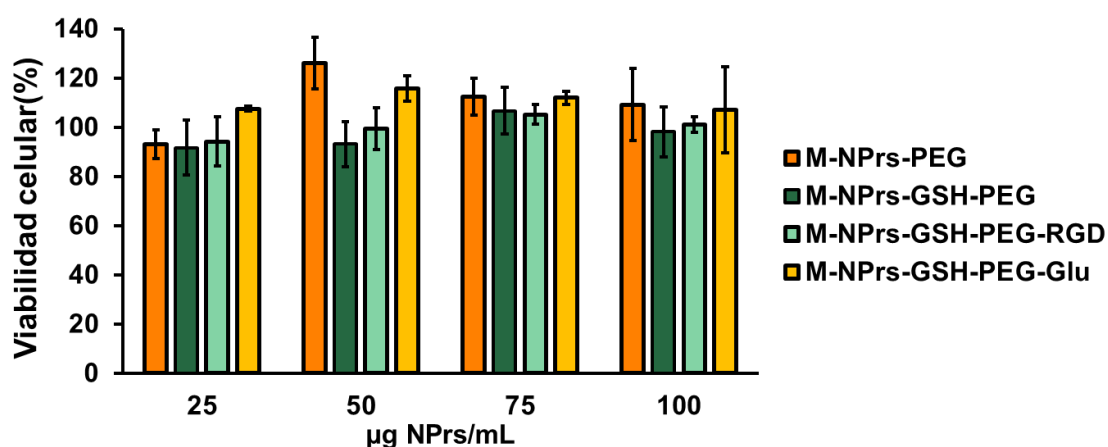


Figura 11. Viabilidad por ensayo MTT de células Vero después de incubarlas con diferentes concentraciones de NPrs hasta  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24 h. La viabilidad de las células tratadas con nanopartículas es similar comparada con las células control.

La internalización celular de los NPrs de oro se evalúa por microscopía de campo claro y campo oscuro/fluorescencia (Figura 12). Se incuban células Vero con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de M-NPrs-PEG o M-NPrs-GSH-PEG durante

## Capítulo 4

24 horas y posteriormente se lavan para eliminar todos los NPRs que no estaban adsorbidos o no habían sido internalizados por las células.

En los estudios de microscopía de campo claro la visualización de puntos verdes es signo de la presencia de NPRs. En el caso de los M-NPrs-PEG, se observa una alta concentración de áreas verdes en el medio intracelular, por lo que los NPR tienen una concentración alta dentro de la célula como se había descrito con anterioridad (Figura 12, C).<sup>16-18</sup> Por el contrario, M-NPrs-GSH-PEG apenas internalizan en la célula (Figura 12, B) y solo se aprecian ciertos agregados de las nanopartículas. Para confirmar estos estudios, se evalúa la internalización por microscopía de campo oscuro/fluorescencia. En esta técnica la presencia de NPRs de oro produce puntos brillantes debido a la dispersión más intensa de la luz (Figura 12, D-F).<sup>11,52</sup> Por otro lado, los núcleos celulares se tiñen de azul con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para poder localizar las células. En el caso de los M-NPrs-PEG se observa que los NPRs están en el citoplasma cercanos al núcleo de la célula. Para los M-NPrs-GSH-PEG se observa algunos NPRs alrededor de la célula, pero probablemente se trate de agregados de nanopartículas, tal y como se ha observado por microscopía de campo claro.

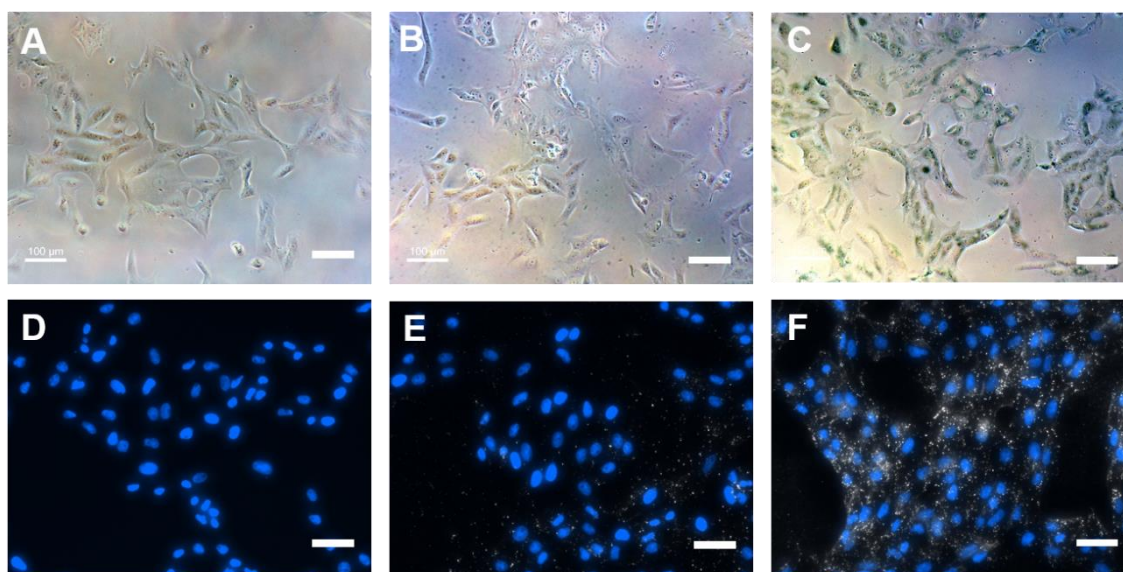


Figura 12. Imágenes de microscopía de campo claro (A, B, C) y campo oscuro (D, E, F) de la internalización celular de AuNPrs. Los núcleos celulares se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). (A, D). Las células Vero como control negativo y tratadas con (B, E) M-NPrs-GSH-PEG, y (C, F) M-NPrs-PEG. Las células se trataron con los NPrs a una concentración de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  durante 24 h. Las barras de escala corresponden a  $50 \mu\text{m}$ .

Las técnicas de microscopía muestran, por lo tanto, que para M-NPrs-GSH-PEG se produce una menor internalización que para M-NPrs-PEG. Dada la similitud entre ambos materiales la presencia de glutatión en el recubrimiento debe ser la causa de esta diferencia en la absorción celular. La PEGilación de los NPrs de oro para obtener M-NPrs-PEG debe realizarse a una fuerza iónica relativamente baja con PEG de 5 kDa para asegurar la estabilidad de los NPrs en el proceso. En estas condiciones, el empaquetamiento denso (régimen de cepillo) está impedido por una conformación de champiñón de las moléculas de PEG.<sup>53</sup> La PEGilación se realizó en las mismas condiciones para M-NPr-GSH-PEG. Sin embargo, parte de la superficie de oro ya estaría recubierta por moléculas de GSH y las moléculas de PEG no podrían desplazar cubriendo los espacios entre los puntos de unión de las grandes moléculas de PEG. Además, la carga negativa de glutatión podría influir en la conformación de PEG debido a la repulsión

## Capítulo 4

aniónica. Ambos efectos permitirían un recubrimiento más efectivo de la superficie de oro. Como resultado, las interacciones no específicas serían menos importantes para M-NPr-GSH-PEG que para M-NPr-PEG, dando lugar a una disminución de la absorción celular.

La absorción de M-NPr-PEG por las células no es específica por lo que en una eventual aplicación terapéutica no se tendría selectividad. Sin embargo, como M-NPr-GSH-PEG no muestra casi interacciones no específicas con las células se podrían utilizar en terapia dirigida funcionalizando la superficie con anticuerpos o péptidos específicos de receptores sobreexpresados en los tejidos enfermos.

### 2.3.2. Mejora de la internalización de los nanoprismas purificados con GSH

La ausencia de internalización o interacciones no específicas con las células abre la oportunidad para conseguir terapias selectivas utilizando NPrs-GSH-PEG. Para ello bastaría con funcionalizar los NPrs-GSH-PEG con moléculas dirigidas a receptores específicos del tipo celular al que se pretende dirigir la terapia.<sup>54</sup> Para esta prueba de concepto se seleccionan dos moléculas pequeñas vectorizantes que habían proporcionado buenos resultados para conseguir terapias dirigidas con otras nanopartículas.<sup>55</sup> Por un lado, los péptidos con el motivo arginina-glicina-aspartato (Figura 13, A), RGD, promueven la adhesión a las células a través de la unión a integrinas.<sup>56</sup> Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos que funcionan como sensores mecánicos de moléculas adheridas y como plataformas de transducción de señal en multitud de procesos biológicos.<sup>57</sup> Esta secuencia ha demostrado unirse a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ <sup>58</sup> y se plantea utilizarla para una prueba de concepto de direccionamiento (*targeting*) activo. Por otro lado, los carbohidratos son responsables de la comunicación celular en la membrana

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

exterior de la mayoría de las células, en las que aparecen conjugados con esfingolípidos (glicoesfingolípidos) o proteínas (glicoproteínas).<sup>59</sup> Como resultado, la mayor parte de células poseen receptores en la membrana que reconocen carbohidratos. Para la prueba de concepto de este direccionamiento menos específico, seleccionamos un derivado de glucosa (Figura 13, B), 4-amino- $\beta$ -D-glucopiranosido, que favorece la interacción con las células, pero proporciona una interacción menos específica.

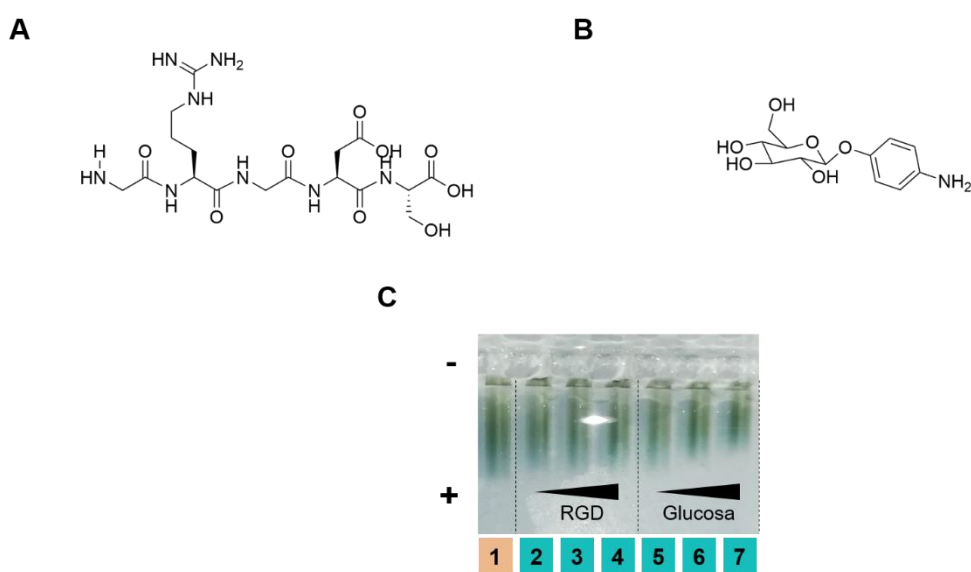


Figura 13. (A) y (B) Estructura de los agentes vectorizantes: péptido con el motivo RGD (GRGDS) y el derivado de glucosa (4-amino- $\beta$ -D-glucopiranosido). (C) Gel de electroforesis comparativo de los M-NPrs-GSH-PEG (1), Nanoprismas derivatizados con: una secuencia Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (M-NPr-GSH-PEG-RGD) (2-4) y con un 4-amino- $\beta$ -D-glucopiranosido (M-NPr-GSH-PEG-Glu) (5-7).

Para la derivatización de los NPrs, se aplican unas pequeñas modificaciones al protocolo publicado para la funcionalización de NPrs con glucosa.<sup>39</sup> Se usan 0,5 mg de NPrs en 1 mL de disolución de MES 10 mM y se activan los grupos carboxilos de los NPrs mediante el acoplamiento por EDC/sulfo-NHS a 37 °C durante 30 min. El exceso de agentes activantes que no han reaccionado se retira por medio de centrifugación. A continuación, se añaden diferentes cantidades de RGD (4, 20 y 40 nmol) para evaluar cuál es

## Capítulo 4

la concentración más adecuada para los experimentos de internalización. Tras 2h de incubación, las nanopartículas se bloquean con tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Las concentraciones estudiadas de RGD no afectan a la estabilidad de las nanopartículas. Los NPRs derivatizados con el péptido RGD no presentan pequeñas diferencias en la movilidad electroforética de las nanopartículas (Figura 13, C). Es un resultado esperable ya el balance de cargas no se modifica al unirse las moléculas de RGD con los grupos carboxilato de la superficie. Una vez formada la amida la carga neta del péptido a pH 7,4 es -1, como la carga del carboxilato del PEG inicial. No se puede cuantificar el rendimiento de la funcionalización mediante Bradford o Micro-BCA por la interferencia de la sulfo-NHS<sup>60</sup> que se utiliza para la activación de los grupos carboxilo y de la correspondiente urea que se produce en la reacción.

En el caso de la derivatización con glucosa, se usan mayores cantidades de esta molécula con el objetivo de recubrir toda la superficie (50, 250 y 500 nmol) y se aplica el mismo protocolo que para el péptido RGD. Tras la funcionalización las nanopartículas se mantienen estables y se produce una disminución en la movilidad electroforética cuando se aumenta la cantidad de molécula usada (Figura 13, C). La glucosa posee una carga neutra una vez que se ha formado el enlace amida con el grupo carboxilato, por lo que al funcionalizarse, la nanopartícula va perdiendo carga superficial.

Las nanopartículas funcionalizadas se incuban durante 24 h con las células para realizar un estudio de internalización de los materiales. La microscopía de campo oscuro muestra que para una baja funcionalización con RGD se obtienen unos resultados similares a M-NPrs-GSH-PEG y los M-NPrs-GSH-PEG-RGD no se internalizan (Figura 14, D). A partir de 20 nmol de RGD no se observan grandes diferencias con la máxima concentración del péptido en la internalización (Figura 14, E-F).

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

Por otro lado, para los NPRs derivatizados con glucosa (M-NPrs-GSH-PEG-Glu), únicamente se estudia la concentración más alta ya que es la proporción usada en trabajos previos.<sup>61</sup> El tratamiento de las células Vero con M-NPrs-GSH-PEG-Glu producen una baja internalización (Figura 14, C).

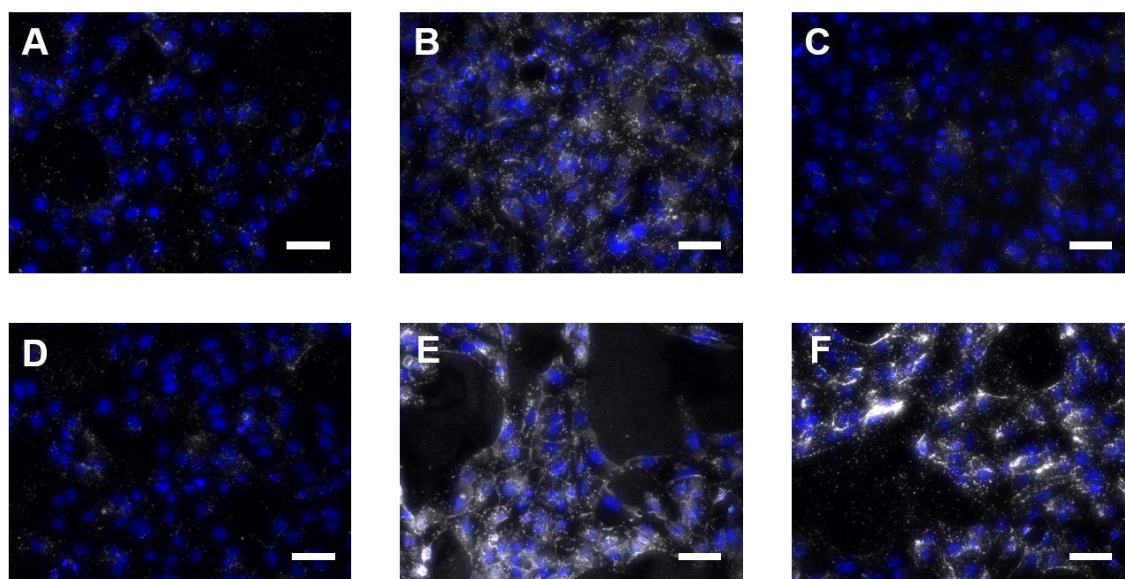


Figura 14. Imágenes de microscopía de campo oscuro de la internalización celular de AuNPrs. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las células Vero tratadas con (A) M-NPr-GSH-PEG, (B) M-NPr-PEG, (C) M-NPr-GSH-PEG-Glu y (D-F) M-NPr-GSH-PEG funcionalizadas con una secuencia Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (M-NPr-GSH-PEG-RGD) usando 4, 20 y 40 nmol de RGD respectivamente. Las células se trataron con los NPRs a una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24 h. Las barras de escala corresponden a  $50 \mu\text{m}$ .

Aun así, estos resultados deben tratarse con cautela, la microscopía de campo oscuro no permite saber cuantitativamente si la internalización celular era más grande con RGD. El análisis cuantitativo por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) confirmó esta diferencia (Figura 15). Los resultados muestran que si bien la concentración de M-NPr-PEG internalizado en las células Vero fue igual a  $7,58 \text{ pg}$  de Au por célula, la concentración de M-NPr-GSH-PEG internalizada fue solo de



## Capítulo 4

1,25 pg de Au por célula, es decir, aproximadamente seis veces menor que para M-NPr-PEG (Figura 15). La concentración de M-NPr-GSH-PEG-Glu internalizada fue 1,83 pg Au por célula, una cantidad mayor que para los M-NPrs-GSH-PEG tal como se esperaba, pero menor a la de los M-NPrs-GSH-PEG-RGD para los que se obtiene una concentración de 2,50 pg Au por célula, lo que representa un aumento de dos veces en comparación a M-NPr-GSH-PEG. Estos resultados muestran claramente que, en contraste con NPrs PEGilados anteriores, M-NPr-GSH-PEG puede ser dirigido selectivamente a células diana con una estrategia de funcionalización apropiada, mientras se evita la absorción no específica no deseada por otras células.

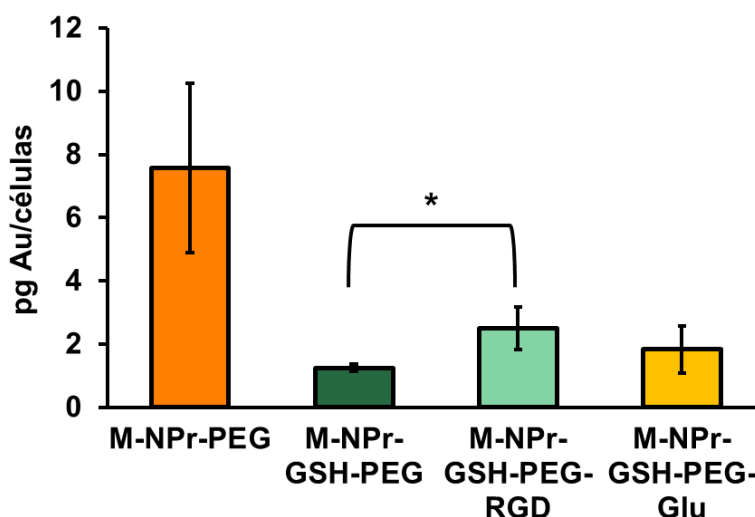


Figura 15. Cantidad de NPrs internalizados por las células Vero después de 24 h de la incubación con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NPrs. La cuantificación de oro se midió por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Se determina que los resultados son estadísticamente significativos mediante la prueba del “t” de Student (\* $p < 0.05$ ).

### 2.3.3 Estudios de hipertermia óptica con nanoprismas en células adherentes

Tal como se comentó en la introducción, las nanopartículas de oro son capaces de calentar al irradiarlas con un láser que coincida con su LSPR. En



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

el caso de nuestros NPrs esta banda se encuentra en la zona NIR del espectro donde la absorción de moléculas biológicas es baja (Figura 1). Además, los M-NPrs-GSH-PEG no se internalizan inespecíficamente y permiten hacer direccionamiento activo en las células de interés. Por lo tanto, se plantea que los NPrs-GSH-PEG serían candidatos ideales para su uso en terapia fototérmica. Antes de iniciar los experimentos *in vitro* se estudia la capacidad de calentamiento de estos materiales. Para ello, se usa un diodo láser de 3 W cuya longitud de onda es 1064 nm. En la Figura 16, se presenta el sistema utilizado para determinar los incrementos de temperatura de la disolución debido a la interacción de la radiación del láser con los NPrs. A la izquierda se coloca la fuente de irradiación láser que tiene acoplado un sistema de refrigeración para mantener la temperatura de la fuente del láser por debajo de 30 °C (la temperatura de la fuente afecta a la potencia transmitida por el láser). Asimismo, para evitar el apagado y encendido del láser reiteradamente durante los experimentos de irradiación, se coloca un mecanismo de cierre. Luego, se coloca la cubeta de cuarzo de 1,5 mL junto con un agitador magnético para que el calor se distribuya homogéneamente en toda la disolución. Posteriormente, se coloca un potenciómetro para determinar la cantidad de potencia que no ha sido absorbida por la disolución. Dentro de la cubeta, a una altura mayor (2 cm) de donde pasa el haz del láser, se coloca una sonda de temperatura para registrar los cambios de temperatura de la disolución. Asimismo, se registran los cambios de la temperatura de la habitación utilizando una segunda sonda y así se confirma que no hay efectos de la curva en la temperatura ambiente.

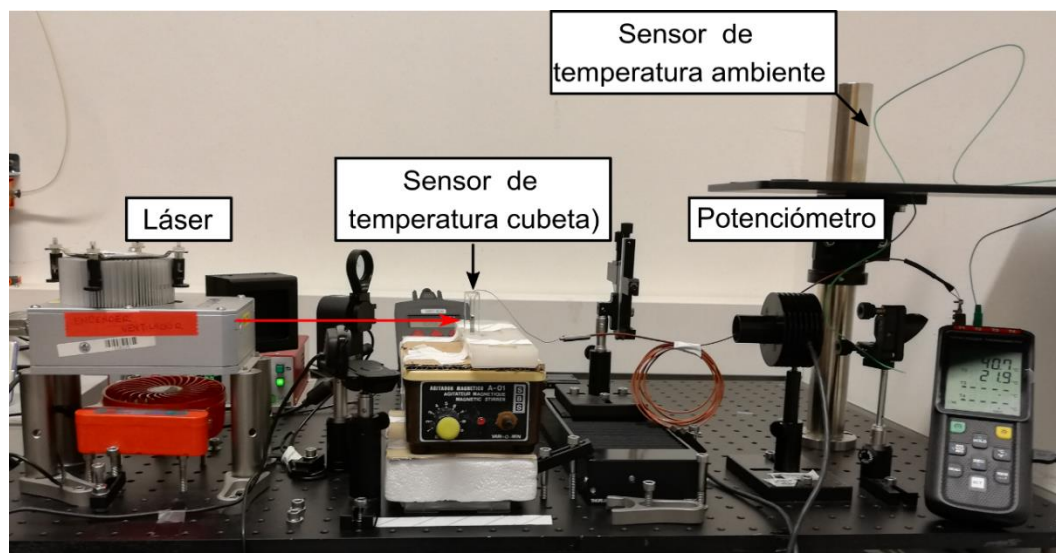


Figura 16. Sistema para monitorizar los incrementos de temperatura de las muestras de nanopartículas cuando se irradia con un láser. El sistema está compuesto de la fuente de irradiación láser (láser), la cubeta donde se coloca la muestra que está sobre una placa agitadora para homogenizar la temperatura de la disolución, el sistema de registro de la temperatura que se divide en dos sondas de temperatura: una sonda mide la temperatura de la disolución, y la segunda sonda mide la temperatura ambiente. Finalmente, el potenciómetro para determinar la potencia que no ha sido absorbida por la muestra.

Se coloca 1 mL de disolución de NPRs en la cubeta y se irradia con el láser durante 20 min usando 1 W de potencia (la densidad de potencia son  $32 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , el diámetro del haz es de 0,2 cm). Por otro lado, la concentración de la nanopartícula también afecta a la cantidad de calor producido por la nanopartícula. Por ello iniciamos el estudio con concentraciones de M-NPRs-GSH-PEG crecientes entre 10 y  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 17, A). Al aumentar la concentración de las nanopartículas se produce un aumento de la temperatura de la disolución. Entre 50 y  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , se satura la cantidad de energía que se transforma en calor y la energía transmitida es inferior a un 10% calculada a partir de la potencia del haz a la salida de la cubeta. Por esta razón se decide trabajar con una concentración de NPRs no superior a  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

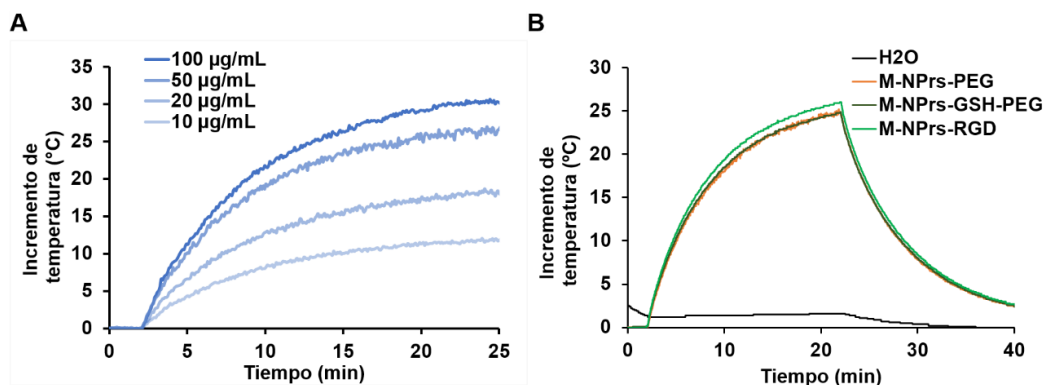


Figura 17. (A) Cambio de temperatura de la dispersión acuosa de M-NPrs-GSH-PEG a diferentes concentraciones con un láser NIR (1064 nm, 1W). Sobre 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  la transmisión está por debajo del 10%. (B) Cambio de la temperatura de la irradiación de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de una dispersión acuosa de M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-PEG en el que se irradia la muestra durante 40 min, y luego se cierra el láser.

Por otro lado, se ha determinado la eficiencia de calentamiento de los materiales preparados, M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-PEG, para estudiar si el recubrimiento afecta a la transformación de la energía emitida del láser y al calor producido en la disolución (Figura 17, B). La disolución se irradia con potencia constante durante 40 min y la temperatura aumenta hasta alcanzar una meseta a los 30 min. A esta temperatura, el calor generado por la irradiación de las nanopartículas es igual al calor perdido por la disolución mediante diversos mecanismos. Estas pérdidas se pueden estimar a partir de la curva de enfriamiento que se obtiene apagando el láser y monitorizando la temperatura durante 20 min. Cuando la disolución solo contiene agua, el aumento de la temperatura es de unos pocos grados. Mientras que las dispersiones de nanopartículas M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-RGD y M-NPrs-PEG presentan curvas de calentamiento y enfriamientos muy similares ya que presentan LSPR y absorbancias también muy similares. Se confirma que el recubrimiento no afecta a la eficiencia de calentamiento.

## Capítulo 4

Una vez confirmado que ambos materiales presentan eficiencias de calentamiento similares se inicia el estudio *in vitro*. Para ello, se incuban las células Vero con las nanopartículas a  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Tras 24 h de incubación, se realizan varios lavados con DPBS para retirar los NPrs que no se han internalizado. En la Figura 18 se muestra una foto del sistema utilizado para llevar a cabo las irradiaciones. A diferencia de las medidas de calentamiento, se modifica el camino óptico del haz del láser para que irradie un soporte que tiene una apertura de 1 cm de diámetro, y permite irradiar los pocillos por separado (Figura 18, A). La placa de pocillos se coloca en una cámara para mantener la temperatura constante entre 37 y 42 °C. Tras una serie de optimizaciones de la potencia, los pocillos se irradian con 1600 mW de potencia de láser durante 5 min (equivale a una densidad de potencia de  $51 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

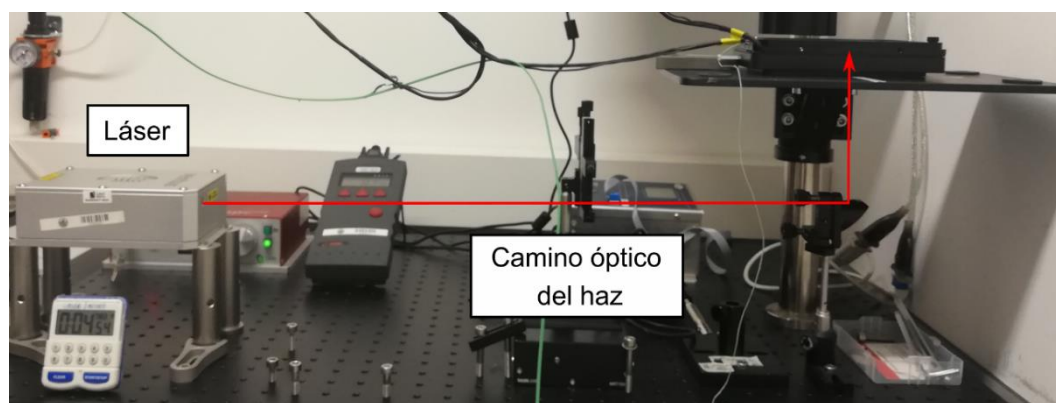


Figura 18. (A) Sistema óptico para la irradiación de células en placas de 96 pocillos. El sistema está compuesto de la fuente de irradiación del láser, un espejo para modificar el camino óptico, y la placa de célula se coloca dentro de una cámara para mantener la temperatura de las células entre 37-42 °C.

Tras la irradiación las células se dejan incubando durante 5 h para dejar que se activen los posibles mecanismos de muerte por apoptosis. Para evaluar la viabilidad de las células se utiliza un ensayo colorimétrico MTT (Figura 19). En ausencia de nanopartículas, la viabilidad de las células no se

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

ve afectada por el láser produciéndose una disminución de la viabilidad menor de un 5%. Cuando las células se tratan con M-NPrs-GSH-PEG y se irradian con el láser, la viabilidad disminuye menos de un 20%. Por el contrario, para las células tratadas con M-NPrs-PEG la viabilidad disminuye en más de un 50 % tras la irradiación. Dado que la eficiencia térmica de ambos tipos de nanopartículas es similar, la diferencia se debe a que M-NPrs-PEG se internalizan en mayor proporción por las células Vero. Cuando se funcionalizan M-NPrs-GSH-PEG con agentes vectorizantes se consigue la internalización de las NPs y la disminución de la viabilidad celular con la irradiación, alcanzando valores de 30 y 47 % para M-NPrs-GSH-PEG-RGD y M-NPrs-GSH-PEG-Glu, respectivamente.

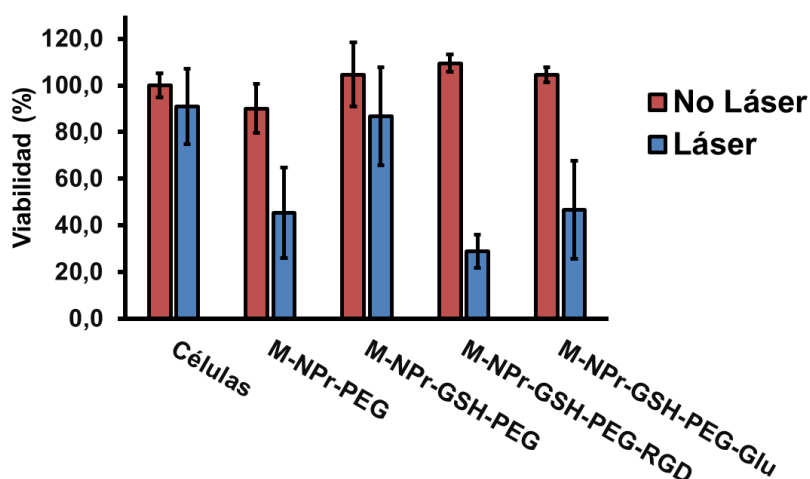


Figura 19. Resultados del ensayo de viabilidad por MTT de las células Vero irradiadas con el láser. Las células se han tratado con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NPrs durante 24 h. El exceso de nanopartícula se lava varias veces. Posteriormente, se irradia con el láser a una potencia de 1600 mW durante 5 min. El MTT se realiza 5 horas después de la irradiación por triplicado.

Tras estos buenos resultados, se estudia la viabilidad celular por microscopía de fluorescencia. Se repiten los ensayos de irradiación, y tras 5 h de incubación, se tiñen las células con un kit de citotoxicidad de

## Capítulo 4

LIVE/DEAD (Invitrogen). En este ensayo, las células se incuban con fluoróforos de dos colores para determinar la viabilidad de dichas células (Figura 20): Calceína AM (Acetoximetil) y homodímero de etidio (EthD-1) miden respectivamente la actividad de la esterasa intracelular<sup>62-64</sup> y la integridad de la membrana<sup>65</sup>, sendos parámetros de viabilidad celular. Como resultado se pueden medir de forma simultánea las células vivas, que se tiñen de color verde en el citosol, y las células muertas, cuyo núcleo se tiñe de rojo por el homodímero de etidio.

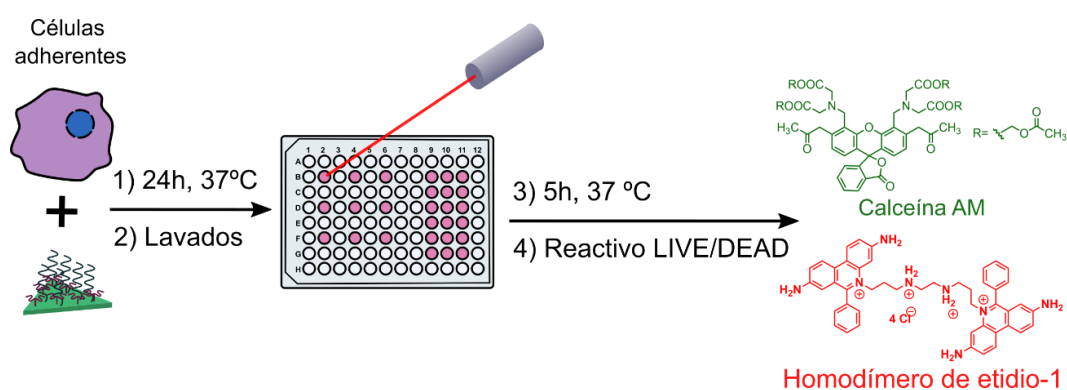


Figura 20. Esquema de trabajo de la irradiación con láser. Se divide en tres etapas: incubación de las células con las nanopartículas, irradiación de los pocillos y posterior visualización de las células por microscopia de fluorescencia tratando las células con calceína y homodímero de etidio.

Cuando se irradian las células que no se han tratado con nanopartículas, su viabilidad no se ve afectada y, en consecuencia, todas las células están de color verde (Figura 21).. Al irradiar las células tratadas con M-NPrs-GSH-PEG tampoco se produce muerte de las células, confirmando el resultado de que no existe internalización cuando se usan estas nanopartículas. En el caso, de los NPrs purificados por gel de electroforesis, las células se levantaron en las zonas donde se había irradiado con el láser. Este fenómeno no se produce en el experimento de control en el que células no tratadas con NPrs son irradiadas con el láser. El levantamiento de las



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

células en la zona irradiada para muestras tratadas con M-NPrs-PEG puede deberse a un efecto producido por el calentamiento. Por otro lado, M-NPrs-GSH-PEG derivatizados con RGD y glucosa se produce reducción de la viabilidad, observando el mismo aro que en el caso de los M-NPrs-PEG. Asimismo, cabe destacar que los NPrs funcionalizados con glucosa mostraron menos efectividad, y para los próximos experimentos se decide continuar únicamente con los M-NPrs-GSH-PEG-RGD.

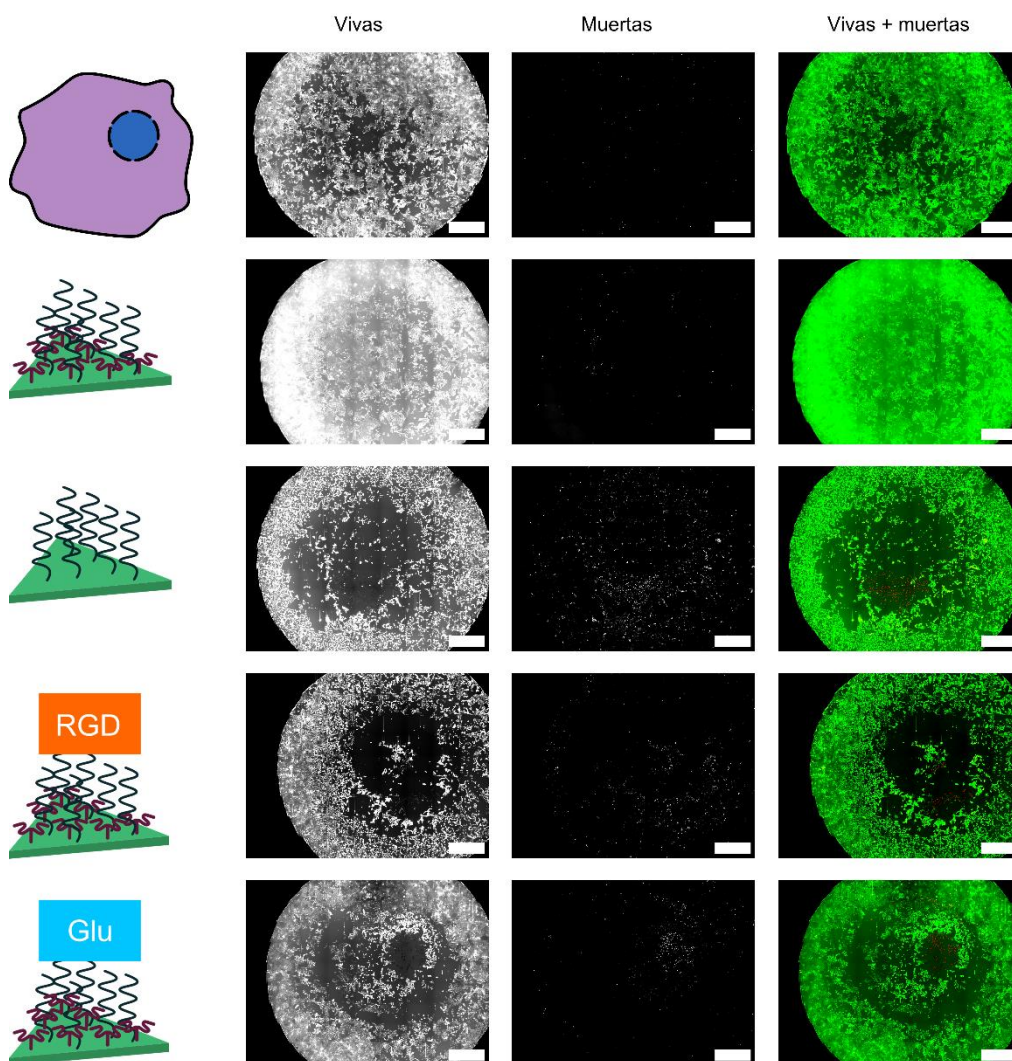


Figura 21. Estudio de irradiación con células Vero incubadas con M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-RGD y M-NPrs-GSH-Glu a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24h. Las fotos de microscopia corresponden a células teñidas con calceína (vivas), y homodímero de etidio (muertas), y la combinación de los dos canales (vivas+muertas). Las células tratadas con las nanopartículas se irradian con un láser a una potencia de 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 5 h después de la irradiación. Las barras de escala corresponden a 1000  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 4

El problema del sistema utilizado es que únicamente se está irradiando un 7% de todo el pocillo y la densidad de potencia es demasiado alta ( $51 \text{ W/cm}^2$ ), para su uso en aplicaciones biomédicas.<sup>9</sup> Para reducir el efecto de obtenido con esa densidad de potencia y mejorar los resultados de irradiación se pueden modificar los parámetros de la irradiación: longitud de onda del láser, densidad de potencia, número de irradiaciones, distancia del láser, duración y concentración de las nanopartículas.

Siendo el tamaño del haz de láser un factor importante para reducir la densidad de potencia se opta por utilizar un expansor del haz de tipo Galileano que permite aumentar el tamaño del haz entre 2x-5x. Por lo tanto, se ajusta el sistema para tener un diámetro de haz de 1 cm. En estas condiciones se estudia el efecto que tiene el tiempo y la potencia del láser mientras se mantiene la concentración de las nanopartículas constante a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nos centramos en las nanopartículas M-NPrs-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-RGD (Figura 22). Trabajamos con tiempos inferiores a 5 min para no alargar el tiempo global del experimento, ya que las células no se encuentran en la situación óptima de  $\text{CO}_2$  y de temperatura. Asimismo, se seleccionan diferentes potencias 1173, 1640, 2100 mW ( $1,5, 2,1, 2,7 \text{ W/cm}^2$ ) para ver las diferencias en el efecto producido. Tiempos de 1 y 3 min no fueron suficientes para producir la muerte de las células, y solo a partir de 5 min se observa marcaje de muerte. Para este estudio se ha descartado detectar la posible muerte por apoptosis ya que el homodímero de etidio solo es capaz de permear en células necróticas. Al aumentar la potencia se produce una mayor muerte alrededor de todo el pocillo. Sin embargo, la potencia más alta no proporciona diferencias entre los diferentes materiales. Por ello, se selecciona la potencia intermedia, 1640 mW.



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

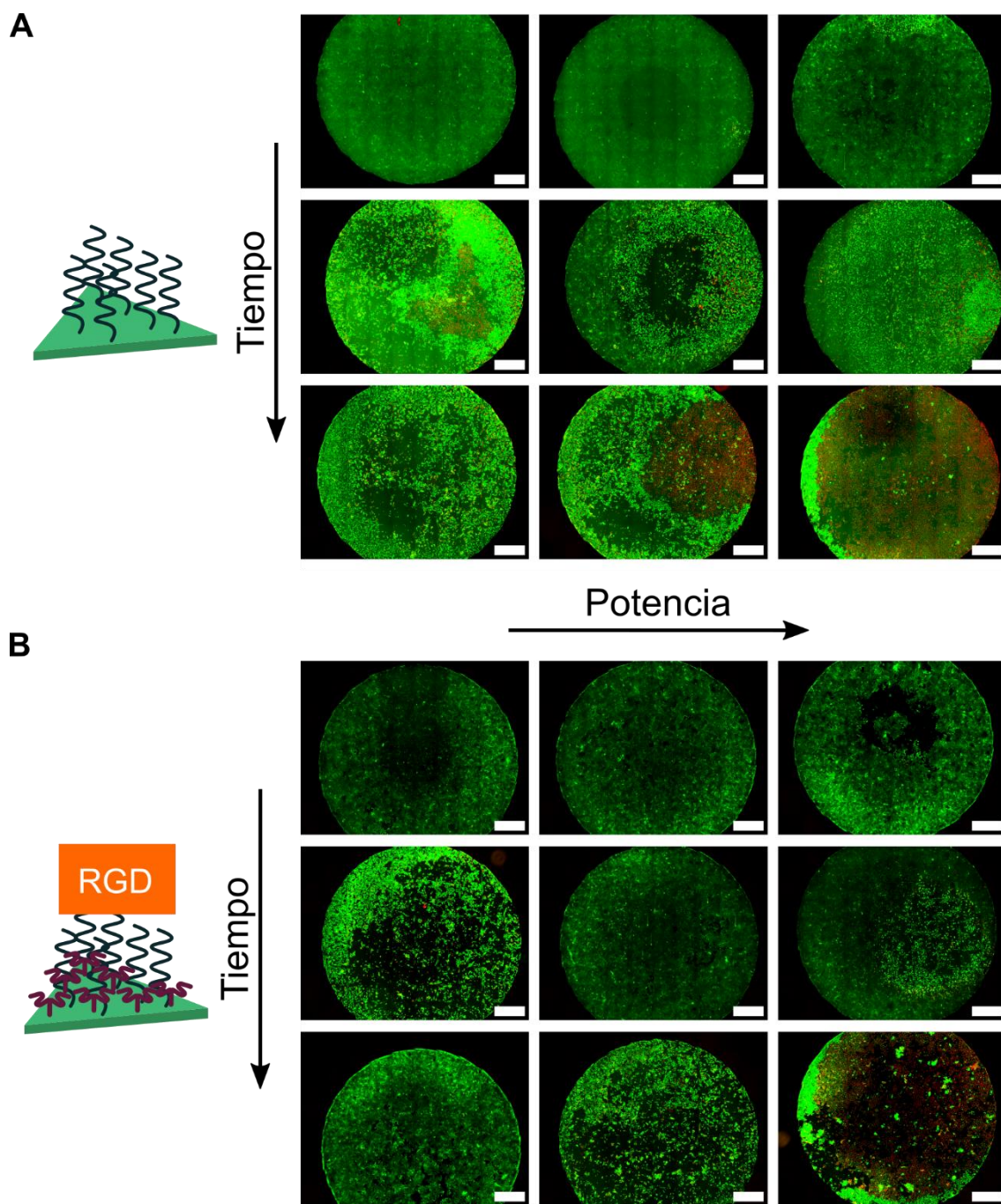


Figura 22. Estudio de irradiación variando la potencia de láser (1173, 1640, 2100 mW) y los tiempos de irradiación (1, 3 y 5 min). Las células Vero se incuban M-NPrs-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-RGD a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24 h. Al día siguiente se retira el exceso de nanopartículas, y las células tratadas se irradian con un láser cuyo haz se ha expandido para irradiar todo el pocillo. Las fotos se realizan 5 h después de la irradiación. Las fotos de microscopia corresponden a células teñidas con calceína (vivas), y homodímero de etidio (muertas), y la combinación de los dos canales (vivas+muertas). Las barras de escala corresponden a  $1000 \mu\text{m}$ .

## Capítulo 4

Una vez optimizadas las condiciones de tiempo y potencia del láser, se estudia el efecto que tiene la concentración de las nanopartículas en estas condiciones (Figura 23). Es de esperar que un aumento de concentración favorezca que internalicen más nanopartículas en la célula, y se observe mayor muerte celular. Las nanopartículas no son citotóxicas si no hay irradiación en las células. Esto sucede incluso para la concentración más alta de los M-NPrs-GSH-PEG. Cuando se irradian con el láser las nanopartículas purificadas por GSH, no se produce muerte celular, lo que confirma que M-NPrs-GSH-PEG tiene la superficie completamente pasivada y no interaccionan con los receptores de la célula. En cambio, las nanopartículas conjugadas con el péptido RGD internalizan, y a valores superiores a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  se produce muerte por necrosis en todo el pocillo. Este mismo resultado se repite cuando se utilizan los M-NPrs-PEG.

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

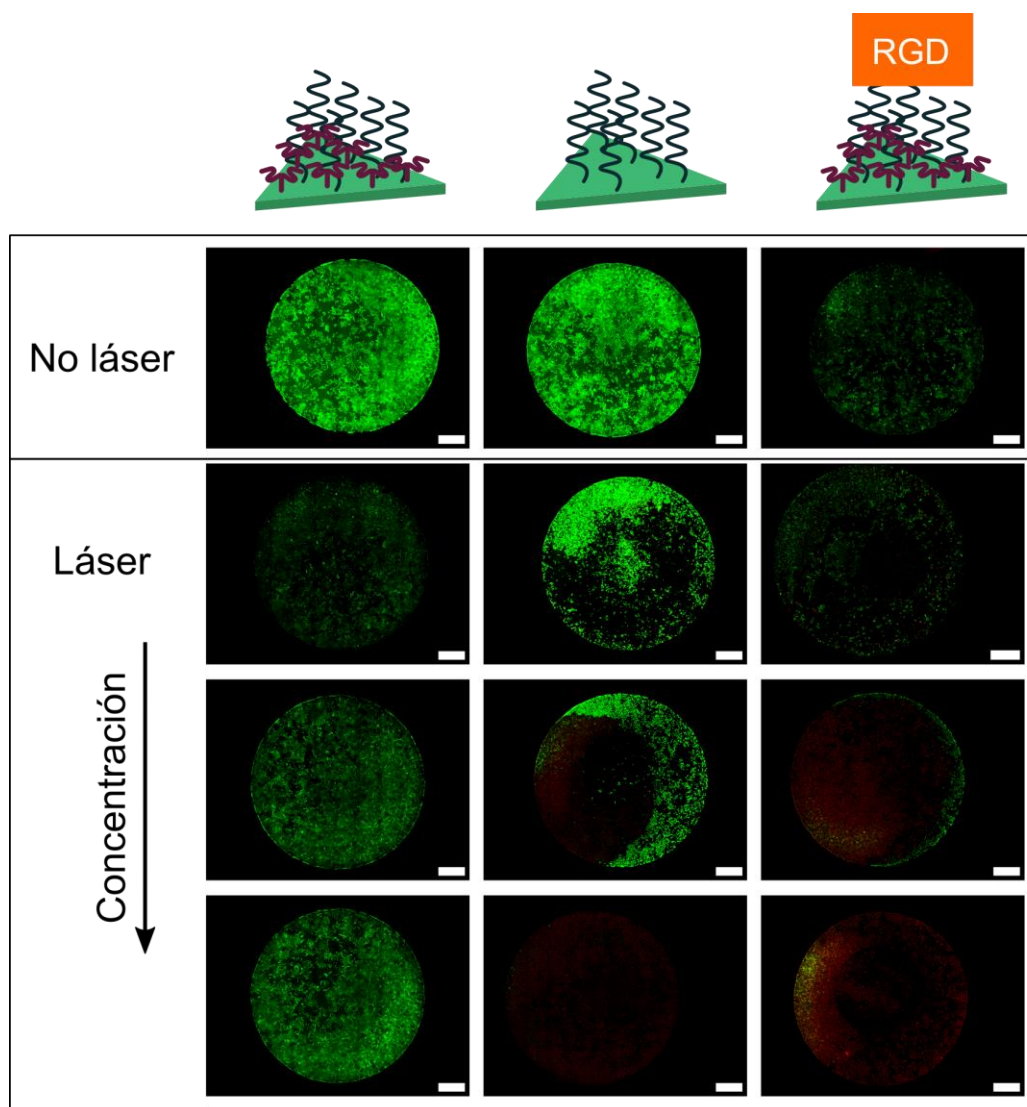


Figura 23. Estudio de irradiación con láser de células Vero tratadas con nanoprismas a diferentes concentraciones (50, 100 y 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las células se incuban con M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-RGD durante 24 h. Al día siguiente se retira el exceso de nanopartículas, y las células tratadas se irradian a 1600 mW durante 5 min con un láser que se ha expandido el haz para irradiar todo el pocillo. Las fotos se realizan 5 h después de la irradiación. Las fotos corresponden a la microscopia de fluorescencia de células teñidas con calceína (vivas), y homodímero de etidio (muertas), y la combinación de los dos canales (vivas+muertas). Las barras de escala corresponden a 1000  $\mu\text{m}$ .

Para cerciorarnos que los resultados son reproducibles en otras líneas celulares, se realiza el estudio con un modelo celular de cáncer de mama (MCF-7). Para este experimento se trataron las células con las nanopartículas M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-RGD y M-NPrs-PEG a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 24). Estas células son menos robustas que las Vero, y se

## Capítulo 4

requiere un mayor cuidado cuando se trabaja con ellas. Cuando no se irradia con el láser se aprecia que se han levantado algunas células, pero no se observa la presencia de células muertas (No láser). M-NPrs-GSH-PEG tampoco internalizan en esta línea celular, y solo cuando se une al péptido RGD, las nanopartículas internalizan en las células. En consecuencia, al irradiar con el láser se produce la muerte celular. En este caso los M-NPrs-PEG presentan una mayor muerte. Los resultados confirman que M-NPrs-GSH-PEG presenta mayor selectividad cuando se vectorizan con el agente adecuado. En el próximo capítulo, se evaluará si es posible direccionamiento activo en dos líneas celulares diferentes, donde una de las células no presente el receptor diana.



## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

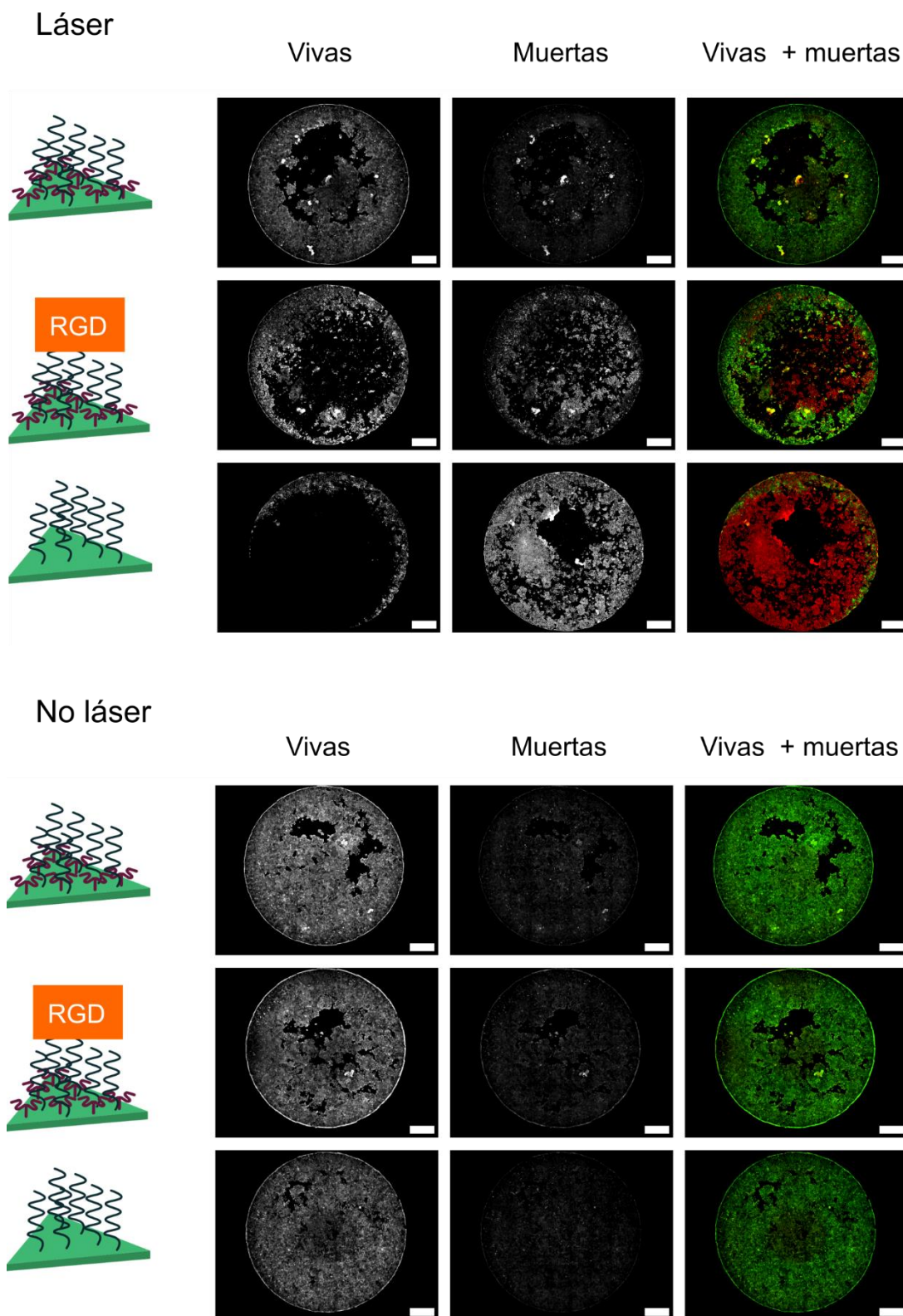


Figura 24. Estudio de irradiación con láser de células MCF-7 (cáncer de mama) tratadas con nanoprismas a  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Las células se incuban con M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-RGD durante 24 h. Al día siguiente se retira el exceso de nanopartículas y, en su caso, las células tratadas se irradian a 1600 mW durante 5 min con un láser cuyo haz se ha expandido para irradiar todo el pocillo. Las fotos se realizan a las 5 h. Las barras de escala corresponden a  $1000 \mu\text{m}$ .

### **3. CONCLUSIONES**

En este capítulo se ha presentado una nueva metodología de purificación basada en el empleo de glutatión para obtener NPrs triangulares de oro sin la necesidad de procedimientos de purificación que requieran mucho tiempo ni materiales específicos. Además, de evitar el uso de materiales tóxicos como el CTAB, que dificultarían su uso en aplicaciones *in vitro* o *in vivo*.

En la escala de 80 mg probada, se obtienen NPrs triangulares con un alto rendimiento ( $42 \pm 7\%$ ), sin nanopartículas de oro esféricas en una única síntesis. El rendimiento de NPrs obtenido fue comparable al rendimiento total (NPrs + NSs) informado para otros métodos sintéticos y al menos en una escala de cantidad de siete veces.<sup>66</sup>

El protocolo de síntesis permite el ajuste de la banda LSPR de los NPrs de oro en la ventana biológica de NIR, al menos de 900 a 1200 nm, lo que lo hace relevante para una variedad de aplicaciones biotecnológicas. Comparamos nuestro método directamente con la separación por electroforesis en gel desarrollada anteriormente y mostramos cómo la purificación con GSH era más fácil de escalar y proporcionaba un mejor rendimiento y una mayor estabilidad.

Además, los nanoprismas separados con GSH muestran menos interacciones no específicas con células que pueden cambiarse con ligandos vectorizantes o de orientación que allanan el camino para una mayor selectividad en aplicaciones terapéuticas. Asimismo, demostramos su uso en aplicaciones de hipertermia óptica en dos líneas celulares. Los nanoprismas purificados por esta metodología solo producen la muerte de la célula cuando están funcionalizados con péptidos específicos.

### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1 Materiales y equipos

El yoduro de potasio (KI), el ácido nítrico al 65%, el ácido clorhídrico al 37%, el ácido sulfúrico al 96%, el peróxido de hidrógeno al 33% y el tris(hidroximetil)aminometano se compraron de Panreac®. HS-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CONH-PEG-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-COOH (MW = 5000 g/mol, HS-PEG-COOH) se adquirió de Rapp Polymere. El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) se adquirió de Alpha Aesar. El ácido tetracloroaúrico (III) (HAuCl<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) se adquirió de Strem Chemicals. Hidróxido de sodio (NaOH), tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 4-aminofenil β-D-glucopiranosido, glutatión (GSH), sal de sodio de *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (Ref: G4391-5MG) (RGD) y clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) fueron suministrados por Sigma-Aldrich y utilizados como se recibieron. El medio Eagle completo modificado por Dulbecco (DMEM™), disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y PBS de Dulbecco (DPBS) suplementado con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se compraron de Lonza® (Basilea, Suiza). El DMEM se complementó con un 10% de suero fetal bovino, un 5% de glutaMAX™ y un 5% de penicilina/estreptomicina antes de su uso en cualquier cultivo celular. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se adquirió de Invitrogen™ (MA, EE. UU.). Antes de su uso en la síntesis de nanoprismas de oro, todo el material de vidrio se lavó con agua regia (1: 3 vol/vol ácido nítrico, 65%: ácido clorhídrico, 37%) y se enjuagó a fondo con agua Milli-Q de Millipore Q- Sistema POD®.

Los espectros UV-Vis-NIR se adquirieron usando un espectrofotómetro Jasco V670.

## Capítulo 4

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se recolectaron usando un SEM Inspect F50 de emisión de campo con un sistema EDX INCA PentaFETx3 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) en un rango de energía entre 0-30 keV. (FEI Europa, Eindhoven, Países Bajos) trabajando a 200 kV.

Para la determinación de los rendimientos de síntesis y purificación, se midió la concentración de oro mediante Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) utilizando un Horiba Yobin Yvon Activa (Horiba Scientific, Francia). Para la cuantificación del oro en los estudios de internalización, las muestras se analizaron por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) utilizando un instrumento Agilent 7700 (Agilent Technologies, EE. UU.) en el Servicio Central de Análisis de Bizkaia de la Universidad del País Vasco (EHU).

La densidad óptica ( $\lambda = 555 \text{ nm}$ ) para las mediciones de viabilidad celular en los ensayos MTT se registró utilizando un lector de microplacas de absorción EL 800<sup>TM</sup> (BioTek, VT USA).

Todas las imágenes de campo claro, campo oscuro y fluorescencia de las células se obtuvieron con un Eclipse Ti con sistema de obturador de plano focal (FPS) de Nikon (Tokio, Japón) equipado con un sistema de contraste de fase, un sistema de visualización de campo oscuro y un bloque de filtros  $472 \pm 30/520 \pm 35 \text{ nm}$  (GFP),  $531 \pm 46/593 \pm 40 \text{ nm}$  (TRITC) cube y  $387 \pm 11/447 \pm 60 \text{ nm}$  (DAPI) conectado al software NIS-Elements Microscope Imaging.



### 4.2 Purificación de los nanoprismas

#### 4.2.1. Síntesis de los nanoprismas

La síntesis de los nanoprismas, P-NPr/NS y M-NPr/NS, esta descrita en el Capítulo 2.

#### 4.2.2 Purificación de nanoprismas con banda de LSPR a 1100 nm por precipitación selectiva con GSH (M-GSH)

Para purificar los nanoprismas de M-NPr/NS mediante precipitación selectiva, se agregó un tampón borato de sodio 100 mM pH 8 (concentración final 10 mM) a la mezcla de nanoprismas y nanoesferas (M-NPr/NS) sin tratar después de la síntesis. Luego, se añadió a la dispersión de nanopartículas una solución de glutatión (GSH) en tampón de borato 10 mM pH 8 con una relación GSH: Au de 5:1 (en mg). Después de eso, el pH se elevó a 12 con la adición de NaOH (2 M). Finalmente, la solución se dejó durante toda la noche sin agitar. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante, que en su mayoría contenía NSs. Los NPrs purificados permanecieron en el precipitado verde y pudieron redispersarse fácilmente en agua (M-NPr-GSH).

#### 4.2.3 PEGilación de los M-NPr-GSH con HS-PEG (5 kDa)-COOH

Se añadió una solución acuosa de HS-PEG-COOH (5 kDa) a M-NPr-GSH con una relación PEG:nanoprismas de 2:1 (en mg). Después de eso, el pH se elevó a 12 con la adición de una disolución de NaOH (2 M). Finalmente, la disolución se sonicó durante 1 hora a 60 °C para completar el recubrimiento con PEG. Los nanoprismas resultantes se centrifugaron a 5500 rcf durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los

## Capítulo 4

reactivos sin reaccionar y los subproductos no deseados. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de agua. Se realizaron dos etapas de lavado adicionales con agua Milli-Q usando las mismas condiciones.

### 4.2.4 Purificación de los NPrs-PEG por gel de electroforesis (M-NPr-PEG y P-NPr-PEG)

La dispersión acuosa de NPrs/NSs-PEG (2 mL, 1 mg Au mL<sup>-1</sup>) se mezcló con TBE 0.5x, glicerol al 5% y se cargó en pocillos dentro de un gel de agarosa (2,5%) sumergido en una cubeta de electroforesis llena de TBE 0,5x. La separación por electroforesis se realizó a 120 V durante 15 min (M-NPr/NS-PEG) y 10 min (P-NPr/NS-PEG). Debido a la mayor movilidad electroforética y al menor diámetro hidrodinámico de las NSs en comparación con los NPrs, las nanoesferas entraron en el gel y los nanoprismas se quedaron en los pocillos. Al final del experimento, los NPrs se recuperaron de los pocillos con una micropipeta. Posteriormente, se la centrifugan a 5500 rcf durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los subproductos no deseados del gel. Se realiza una etapa de lavado adicional con agua Milli-Q usando las mismas condiciones.

## 4.3 Caracterización de los materiales

### 4.3.1 Preparación de disoluciones para espectroscopía de UV-vis-NIR y SEM

Para preparar las muestras para los espectros de absorción UV-vis-NIR, la solución de NP (20 µL, 1 mg mL<sup>-1</sup>) se mezcló con 980 µL agua. Los

## **Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión**

espectros de absorción se registraron en una cubeta de cuarzo (0,2 cm × 1 cm, camino óptico = 0,2 cm).

Para preparar las muestras SEM, la solución de NPrs (3 µL, 0,03 mg/mL) se depositó en una oblea de silicio y se dejó secar. La longitud del lado de los NPrs se midió usando el software ImageJ.

### **4.3.2 Rendimiento de la síntesis de los nanoprismas por Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)**

Las muestras se transfirieron a viales Eppendorf para la digestión ácida. Para digerir las muestras, se trataron con 100 µL de solución de piraña (3:1 vol/vol; ácido sulfúrico, 96%: peróxido de hidrógeno, 33%) durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de 300 µL de agua regia (1:3 vol/vol; ácido nítrico, 65%: ácido clorhídrico, 37%) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron a 60 °C durante 15 minutos y se diluyeron con agua Milli-Q a 20 mL. Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y evaluadas por ICP-AES.

### **4.3.3 Prueba de estabilidad con tampones**

La solución de NP (40 µL, 1 mg·mL<sup>-1</sup>) se mezcló con 1,96 mL de la solución tampón en un vial. Los espectros de absorción se registraron después de 30 s, 1, 4 y 12 días usando una cubeta de cuarzo (0,2 cm × 1 cm, camino óptico = 0,2 cm).

## Capítulo 4

### 4.3.4 Cuantificación de proteínas adsorbidas en los nanoprismas por marcaje radioactivo

Para medir la cantidad de albúmina de suero bovino (BSA) en los sobrenadantes se usó un método de cuantificación de proteínas por radiomarcado descrito previamente<sup>67</sup> con modificaciones menores. Brevemente, se incubaron 60 µg de BSA con 5 µCi de Na<sup>125</sup>I y 15 µg de cloramina T como agente oxidante durante 15 segundos a temperatura ambiente en un volumen total de 150 µL de tampón fosfato 0,5 M a pH 7,5. La reacción se terminó inmediatamente añadiendo 150 µl de tampón fosfato 0,5 M a pH 7,5, que contenía 6,7 µg de tirosina y 150 µg de yoduro de potasio. La mezcla se pasó luego a través de columnas PD MiniTrap G-10 (GE Healthcare Life Sciences, Fairfield, CT, EE. UU.) y se determinó su concentración usando un kit de ensayo Pierce Coomassie Plus (Bradford) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) para calibrar las medidas de radioactividad. Para la elución de la proteína, se usó tampón acetato 20 mM, pH 4,7.

La adsorción de la proteína marcada se llevó a cabo mezclando 0,1 mg de los NPRs con 3,6 µg de solución de proteína (120 µg mL<sup>-1</sup> en tampón acetato 20 mM, pH 4,7) en un volumen final de 200 µL. El efecto del pH sobre la adsorción se evaluó utilizando soluciones de BSA preparadas en tampón de acetato de sodio/ácido acético 10 mM a pH 4,7 o tampón HEPES 20 mM a pH 7,4. Las mezclas se agitaron suavemente a 37 °C en un termobloque durante 90 minutos y luego se centrifugaron los NP en una minispin a 6000 rpm durante 15 minutos, tras lo cual se recuperó el sobrenadante. Las nanopartículas con BSA adsorbida se resuspendieron en tres tampones diferentes (tampón de acetato 20 mM a pH 5, tampón HEPES, 20 mM a pH 7 y tampón de borato 20 mM a pH 9). Las mezclas se agitaron suavemente a 37 °C durante 90 minutos y luego las NP se centrifugaron dos

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

veces. Los sobrenadantes y la solución de los nanoprismas se analizaron por conteo de rayos gamma.

### Ejemplo para la estimación del número de moléculas de BSA/nm<sup>2</sup>

El volumen de un átomo de oro es

$$V_{Au} = \frac{M_{Au}}{d \cdot N_A} = 17 \text{ Å}^3 \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde d es la densidad del oro (19,3·g/cm<sup>3</sup>), M<sub>Au</sub> = 197 g/mol y N<sub>A</sub> el número de Avogadro. El número de átomos de oro por partícula se considera que es:

$$N_{\frac{\text{átomos}}{NP}} = \frac{V_{NP}}{V_{Au}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Los nanoprismas (M-NPr-GSH-PEG) con una base de lado 165 nm y un espesor de 9 nm, tienen una superficie es 2,80·10<sup>4</sup> nm<sup>2</sup> y un volumen de 1,06·10<sup>5</sup> nm<sup>3</sup>; entonces el número de átomos de oro por partícula N<sub>atom</sub> / NP = 6,28·10<sup>6</sup> átomos por nanopartícula. Entonces el peso molecular estimado de M-NPrs-GSH-PEG es 1,23·10<sup>9</sup> g/mol. Por ejemplo, la adsorción de BSA en M-NPr-GSH-PEG se obtuvo en 0,96 µg BSA en 100 µg.

## 4.4 Experimentos *in-vitro* de los nanoprismas en células adherentes

Todas las suspensiones de NPrs se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,22 µm (CHMLAB, Barcelona, España) antes de la adición a los cultivos celulares. Los ensayos *in vitro* se realizaron con células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) y MCF-7 (células de cáncer de mama) que se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CCL-81). Las células Vero y MCF-7 se cultivaron a 37 °C en una

## Capítulo 4

atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutaMAX™ 2 mM y 100 U·mL<sup>-1</sup> de penicilina/estreptomicina.

### 4.4.1 Funcionalización de los nanoprismas con Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (péptido RGD) y glucosa (Glu)

Se derivatizaron M-NPr-GSH-PEG con Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (péptido RGD) o glucosa (4-amino-β-D-glucopiranosido). Para promover la internalización celular. Brevemente, se incubaron 0,5 mg de M-NPr-GSH-PEG con 40 μg de EDC y 61 μg de Sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 ° C; los M-NPr-GSH-PEG activados se incubaron luego durante 2 ha temperatura ambiente con diferentes cantidades del péptido RGD o glucosa. Finalmente, se añadieron 14 μg de tris(hidroximetil)aminometano (120 μmol) para derivatizar los grupos carboxílicos activados restantes durante 2 h a temperatura ambiente. Las NP funcionales se lavaron luego del exceso de ligando por centrifugación. Los NPs funcionales se centrifugaron tres veces durante 10 minutos a 6000 rpm, y luego los sedimentos se resuspendieron en agua Milli-Q.

### 4.4.2 Ensayo de viabilidad celular de los nanoprismas por MTT

Las células Vero se sembraron a una densidad de 5 x 10<sup>3</sup> células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. Después de 24 h, el medio se reemplazó por DMEM nuevo que contenía nanoprismas de oro (25, 50, 75 o 100 μg·mL<sup>-1</sup>) y se incubó durante otras 24 h en las mismas condiciones. Para cuantificar la viabilidad de las células mediante el ensayo MTT, se retiró el medio y las células se incubaron con 200 μL de DMEM que contenía 10 μL de 5 mg·mL<sup>-1</sup> de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en la

## Síntesis y purificación de nanoprismas con glutatión

oscuridad en condiciones de cultivo durante 90 min. Durante este tiempo el succinato deshidrogenasa, una enzima mitocondrial presente en las células vivas y dependiente de NAD(P)H, convierte el colorante MTT amarillo y soluble en cristales violetas de formazán. Finalmente, la placa se centrifugó a 1250 rpm durante 25 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los cristales de formazán se solubilizaron con 100 µL de DMSO. Después de la resuspensión adecuada de los cristales, se registró la densidad óptica a 555 nm (OD) usando un lector de placas. El porcentaje de viabilidad celular de cada muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula con 100 µL de DMSO como blanco:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{OD \text{ de la muestra tratada} - OD \text{ del blanco}}{OD \text{ del control sin NPs} - OD \text{ del blanco}} \cdot 100$$

### 4.4.3 Estudios de internalización de los nanoprismas en células Vero por microscopía de campo oscuro

Para la preparación de las muestras de células fijadas para la visualización por microscopía de campo oscuro, se sembraron  $5 \times 10^4$  células Vero por pocillo en un cubreobjetos de vidrio colocado en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante la noche en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Al día siguiente, se agregaron NPrs en DMEM (400 µL/pocillo, 50 µg·mL<sup>-1</sup>) a cada pocillo y se incubaron durante 24 h ( $V_f$  H<sub>2</sub>O < 10%). Las células se lavaron cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, se lavaron dos veces con DPBS y se incubaron durante 10 minutos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (3 µM) para el marcado de los núcleos. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando 6 µL de Prolong® Diamond Antifade Mountant de Life Technologies® (Carlsbad, CA, EE. UU.).

## Capítulo 4

### 4.4.4 Estudios internalización de los nanoprismas en células Vero por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)

El experimento se realizó por triplicado para cada material: M-NPr-PEG, M-NPr-GSH-PEG, M-NPr-GSH-PEG-RGD y el control sin NPrs. Para estos ensayos, se cultivaron  $5 \times 10^4$  células Vero/pocillo durante la noche en condiciones de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 400  $\mu\text{L}$ /pocillo de nanopartículas en DMEM a 50  $\mu\text{g/mL}$  de NPrs (solo DMEM en los experimentos de control) y se incubaron 24 h en condiciones de cultivo. Después de eso, el medio de cultivo se recogió con las nanopartículas no internalizadas y se guardó midiendo su volumen. Las células se lavaron cuatro veces, dos veces con 400  $\mu\text{L}$  de DPBS y dos veces con 400  $\mu\text{L}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente, las células se incubaron 5 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de tripsina a  $37^\circ\text{C}$  y se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de DMEM para inhibir la enzima. El número de células en cada muestra se cuantificó utilizando una cámara Neubauer.

Se añadió solución de piraña (100  $\mu\text{L}$ ) a las muestras celulares para su digestión durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 300  $\mu\text{L}$  de agua regia y 2 horas de digestión a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y se diluyeron con agua Milli-Q a 20 mL. La cantidad de oro se midió por ICP-MS. La cantidad total de oro (NPrs) en 20 mL correspondió a la cantidad total en un pocillo y se dividió por el número de células contadas en el pocillo.

$$\frac{\text{pg Au}}{\text{célula}} = \frac{[Au] \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\text{número total de células}} \cdot 20 \text{ mL} \cdot 1000$$



### 4.4.5 Ensayo de irradiación de nanoprismas con células Vero y MCF-7

Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo para Vero o de  $1,2 \times 10^4$  células por pocillo para MCF-7 en una placa de 96 pocillos con un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de DMEM y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. Después de 24 h, el medio se reemplazó por DMEM nuevo que contenía nanoprismas de oro (50, 100 o 150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Tras 24 h de incubación, las células se lavaron con 100  $\mu\text{L}$  DPBS cuatro veces y finalmente, se resuspendieron con 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo fresco. La placa de 96 pocillos se colocó en una cámara de control de temperatura para mantener a las células entre 37-42 °C. Los pocillos se irradiaron con el láser Quatum Ventus 3 W (1064 nm) a 1600 mW durante 5 min. Todos los ensayos de irradiación se realizaron de la misma manera. Posteriormente, se dejaron las células incubando 5h a 37 °C y se realizó un ensayo de viabilidad por MTT o reactivo de LIVE/DEAD®.

### 4.4.6 Ensayo de viabilidad por reactivo de LIVE/DEAD®

Se seleccionaron muestras de células sin NPRs, cargadas con NPRs, irradiadas o no irradiadas por láser. El reactivo de citotoxicidad LIVE/DEAD® se usó en las muestras seleccionadas. Este kit presenta fluoróforos de dos colores para distinguir las células vivas de las muertas. Los fluoróforos que se usan son calceína AM (Acetoximetil ester) y homodímero de etidio (EthD-1), que reconocen parámetros de viabilidad celular: la actividad de la esterasa intracelular y la integridad de la membrana, respectivamente. 5 h después del experimento de irradiación, se retiró el medio de cultivo, y se añadió DPBS (100  $\mu\text{L}$ ) con calceína AM (2  $\mu\text{M}$ ) y de EthD-1 (4  $\mu\text{M}$ ). Las células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente tapadas de la luz y mediante el software del

## Capítulo 4

microscopio invertido de fluorescencia se programó para realizar varias fotos de fluorescencia con objetivo de 10X para tener una foto completa del pocillo.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Álvaro Artiga por su trabajo inicial para la purificación de los nanoprismas y a Isabel Franco por el material gráfico en las Figuras 4 y 6.

## **6. REFERENCIAS**

- (1) Lyu, Y.; Li, J.; Pu, K. Second Near-Infrared Absorbing Agents for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Small Methods* **2019**, 3 (11), 1–15. <https://doi.org/10.1002/smtd.201900553>.
- (2) Huda, S.; Alam, M. A.; Sharma, P. K. Smart Nanocarriers-Based Drug Delivery for Cancer Therapy: An Innovative and Developing Strategy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, 60 (May), 102018. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102018>.
- (3) Qin, Z.; Bischof, J. C. Thermophysical and Biological Responses of Gold Nanoparticle Laser Heating. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (3), 1191–1217. <https://doi.org/10.1039/c1cs15184c>.
- (4) Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, 5 (9), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>.
- (5) Reguera, J.; Langer, J.; Jiménez De Aberasturi, D.; Liz-Marzán, L. M. Anisotropic Metal Nanoparticles for Surface Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (13), 3866–3885. <https://doi.org/10.1039/c7cs00158d>.
- (6) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 494–521. <https://doi.org/10.1021/cr068126n>.
- (7) Hemmer, E.; Venkatachalam, N.; Hyodo, H.; Hattori, A.; Ebina, Y.; Kishimoto, H.; Soga, K. Upconverting and NIR Emitting Rare Earth Based Nanostructures for NIR-Bioimaging. *Nanoscale* **2013**, 5 (23), 11339. <https://doi.org/10.1039/c3nr02286b>.
- (8) Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Second Window for in Vivo

- Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (11), 710–711. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326>.
- (9) Gonçalves, A. S. C.; Rodrigues, C. F.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. Strategies to Improve the Photothermal Capacity of Gold-Based Nanomedicines. *Acta Biomater.* **2020**, *116*, 105–137. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.008>.
  - (10) Wen, H.; Tamarov, K.; Happonen, E.; Lehto, V. P.; Xu, W. Inorganic Nanomaterials for Photothermal-Based Cancer Theranostics. *Adv. Ther.* **2021**, *4* (2). <https://doi.org/10.1002/adtp.202000207>.
  - (11) Huang, X.; Qian, W.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. The Potential Use of the Enhanced Nonlinear Properties of Gold Nanospheres in Photothermal Cancer Therapy. *Lasers Surg. Med.* **2007**, *39* (9), 747–753. <https://doi.org/10.1002/lsm.20577>.
  - (12) Wang, N.; Zhao, Z.; Lv, Y.; Fan, H.; Bai, H.; Meng, H.; Long, Y.; Fu, T.; Zhang, X.; Tan, W. Gold Nanorod-Photosensitizer Conjugate with Extracellular PH-Driven Tumor Targeting Ability for Photothermal/Photodynamic Therapy. *Nano Res.* **2014**, *7* (9), 1291–1301. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0493-0>.
  - (13) Espinosa, A.; Silva, A. K. A.; Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Péchoux, C.; Desboeufs, K.; Liz-Marzán, L. M.; Wilhelm, C. Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (9), 1040–1048. <https://doi.org/10.1002/adhm.201501035>.
  - (14) Zhang, W.; Ding, X.; Cheng, H.; Yin, C.; Yan, J.; Mou, Z.; Wang, W.; Cui, D.; Fan, C.; Sun, D. Dual-Targeted Gold Nanoprism for Recognition of Early Apoptosis, Dual-Model Imaging and Precise Cancer Photothermal Therapy. *Theranostics* **2019**, *9* (19), 5610–5625. <https://doi.org/10.7150/thno.34755>.
  - (15) Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M.; Folch, Á. A.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Gold Nanoprism–Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation Capacity. *Nanomedicine* **2016**, *11* (22), 2903–2916. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0257>.
  - (16) Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Gold Nanoprism–Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation

- Capacity. *Nanomedicine* **2016**, *11* (22), 2903–2916. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0257>.
- (17) Xie, X.; Liao, J.; Shao, X.; Li, Q.; Lin, Y. The Effect of Shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the Forms of Stars, Rods, and Triangles. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04229-z>.
  - (18) Pérez-Hernández, M.; Del Pino, P.; Mitchell, S. G.; Moros, M.; Stepien, G.; Pelaz, B.; Parak, W. J.; Gálvez, E. M.; Pardo, J.; De La Fuente, J. M. Dissecting the Molecular Mechanism of Apoptosis during Photothermal Therapy Using Gold Nanoprisms. *ACS Nano* **2015**, *9* (1), 52–61. <https://doi.org/10.1021/nn505468v>.
  - (19) Ni, Y.; Kan, C.; Xu, J.; Liu, Y. The Synthesis of High Yield Au Nanoplate and Optimized Optical Properties. *Superlattices Microstruct.* **2018**, *114*, 124–142. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2017.12.021>.
  - (20) Millstone, J. E.; Park, S.; Shuford, K. L.; Qin, L.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Observation of a Quadrupole Plasmon Mode for a Colloidal Solution of Gold Nanoprisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (15), 5312–5313. <https://doi.org/10.1021/ja043245a>.
  - (21) Fan, X.; Guo, Z. R.; Hong, J. M.; Zhang, Y.; Zhang, J. N.; Gu, N. Size-Controlled Growth of Colloidal Gold Nanoplates and Their High-Purity Acquisition. *Nanotechnology* **2010**, *21* (10), 105602. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/10/105602>.
  - (22) Straney, P. J.; Andolina, C. M.; Millstone, J. E. Seedless Initiation as an Efficient, Sustainable Route to Anisotropic Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2013**, *29* (13), 4396–4403. <https://doi.org/10.1021/la400227k>.
  - (23) Walker, D. A.; Browne, K. P.; Kovalczyk, B.; Grzybowski, B. A. Self-Assembly of Nanotriangle Superlattices Facilitated by Repulsive Electrostatic Interactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (38), 6760–6763. <https://doi.org/10.1002/anie.201002558>.
  - (24) Ma, X.; Cheng, Y.; Huang, Y.; Tian, Y.; Wang, S.; Chen, Y. PEGylated Gold Nanoprisms for Photothermal Therapy at Low Laser Power Density. *RSC Adv.* **2015**, *5* (99), 81682–81688. <https://doi.org/10.1039/C5RA17385J>.
  - (25) Alkilany, A. M.; Nalaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708. <https://doi.org/10.1002/sml.200801546>.

## Capítulo 4

- (26) Alkilany, A. M.; Murphy, C. J. Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What We Have Learned so Far? *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (7), 2313–2333. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>.
- (27) Geng, X.; Roth, K. L.; Freyman, M. C.; Liu, J.; Grove, T. Z. Seed-Mediated Biomineralization toward the High Yield Production of Gold Nanoprisms. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (63), 9829–9832. <https://doi.org/10.1039/c6cc04708d>.
- (28) Ah, C. S.; Yun, Y. J.; Park, H. J.; Kim, W. J.; Ha, D. H.; Yun, W. S. Size-Controlled Synthesis of Machinable Single Crystalline Gold Nanoplates. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (22), 5558–5561. <https://doi.org/10.1021/cm051225h>.
- (29) Xiong, Y.; Washio, I.; Chen, J.; Cai, H.; Li, Z. Y.; Xia, Y. Poly (Vinyl Pyrrolidone): A Dual Functional Reductant and Stabilizer for the Facile Synthesis of Noble Metal Nanoplates in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2006**, *22* (20), 8563–8570. <https://doi.org/10.1021/la061323x>.
- (30) Lee, J. H.; Kamada, K.; Enomoto, N.; Hojo, J. Polyhedral Gold Nanoplate: High Fraction Synthesis of Two-Dimensional Nanoparticles through Rapid Heating Process. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (8), 2638–2645. <https://doi.org/10.1021/cg0702075>.
- (31) Viarbitskaya, S.; Teulle, A.; Marty, R.; Sharma, J.; Girard, C.; Arbouet, A.; Dujardin, E. Tailoring and Imaging the Plasmonic Local Density of States in Crystalline Nanoprisms. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (5), 426–432. <https://doi.org/10.1038/nmat3581>.
- (32) Liebig, F.; Sarhan, R. M.; Prietzel, C.; Reinecke, A.; Koetz, J. “Green” Gold Nanotriangles: Synthesis, Purification by Polyelectrolyte/Micelle Depletion Flocculation and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *RSC Adv.* **2016**, *6* (40), 33561–33568. <https://doi.org/10.1039/c6ra04808k>.
- (33) Balasubramanian, S.; Bezawada, S. R.; Raghavachari, D. Green, Selective, Seedless and One-Pot Synthesis of Triangular Au Nanoplates of Controlled Size Using Bael Gum and Mechanistic Study. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (7), 3830–3839. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00596>.
- (34) Sun, Z.; Chen, X.; Wang, L.; Zhang, G.; Jing, B. Synthesis of Gold Nanoplates in Lamellar Liquid Crystal. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *326* (1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.05.006>.
- (35) Ha, T. H.; Koo, H. J.; Chung, B. H. Shape-Controlled Syntheses of

- Gold Nanoprisms and Nanorods Influenced by Specific Adsorption of Halide Ions. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/jp066454l>.
- (36) James, K. T.; O'Toole, M. G.; Patel, D. N.; Zhang, G.; Gobin, a. M.; Keynton, R. S. A High Yield, Controllable Process for Producing Tunable near Infrared-Absorbing Gold Nanoplates. *RSC Adv.* **2015**, *5* (17), 12498–12505. <https://doi.org/10.1039/C4RA14889D>.
- (37) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (38) Zhou, Y.; Zhou, X.; Park, D. J.; Torabi, K.; Brown, K. A.; Jones, M. R.; Zhang, C.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Shape-Selective Deposition and Assembly of Anisotropic Nanoparticles. *Nano Lett.* **2014**, *14* (4), 2157–2161. <https://doi.org/10.1021/nl500471g>.
- (39) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (40) Jones, M. R.; Mirkin, C. A. Bypassing the Limitations of Classical Chemical Purification with DNA-Programmable Nanoparticle Recrystallization. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (10), 2886–2891. <https://doi.org/10.1002/anie.201209504>.
- (41) Park, K.; Koerner, H.; Vaia, R. A. Depletion-Induced Shape and Size Selection of Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2010**, *10* (4), 1433–1439. <https://doi.org/10.1021/nl100345u>.
- (42) Asakura, S.; Oosawa, F. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22* (7), 1255–1256. <https://doi.org/10.1063/1.1740347>.
- (43) Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M. Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 5833–5842. <https://doi.org/10.1021/nn500727w>.
- (44) Smith, C. V.; Jones, D. P.; Guenthner, T. M.; Lash, L. H.; Lauterburg, B. H. Compartmentation of Glutathione: Implications for the Study of Toxicity and Disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *140* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0191>.

## Capítulo 4

- (45) Sudeep, P. K.; Joseph, S. T. S.; Thomas, K. G. Selective Detection of Cysteine and Glutathione Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (18), 6516–6517. <https://doi.org/10.1021/ja051145e>.
- (46) Zhang, S.; Kou, X.; Yang, Z.; Shi, Q.; Stucky, G. D.; Sun, L.; Wang, J.; Yan, C. Nanonecklaces Assembled from Gold Rods, Spheres, and Bipyramids. *Chem. Commun.* **2007**, No. 18, 1816–1818. <https://doi.org/10.1039/b618818d>.
- (47) Gao, J.; Bender, C. M.; Murphy, C. J. Dependence of the Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution. *Langmuir* **2003**, *19* (21), 9065–9070. <https://doi.org/10.1021/la034919i>.
- (48) Bhattarai, S. R.; Derry, P. J.; Aziz, K.; Singh, P. K.; Khoo, A. M.; Chadha, A. S.; Liopo, A.; Zubarev, E. R.; Krishnan, S. Gold Nanotriangles: Scale up and X-Ray Radiosensitization Effects in Mice. *Nanoscale* **2017**, *9* (16), 5085–5093. <https://doi.org/10.1039/c6nr08172j>.
- (49) Liu, J.; Peng, Q. Protein-Gold Nanoparticle Interactions and Their Possible Impact on Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.055>.
- (50) Barbir, R.; Jiménez, R. R.; Martín-Rapún, R.; Strasser, V.; Domazet Jurašin, D.; Dabelić, S.; de la Fuente, J. M.; Vinković Vrček, I. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (23), acsami.1c04063. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04063>.
- (51) Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>.
- (52) Fakhrullin, R.; Nigamatzyanova, L.; Fakhrullina, G. Dark-Field/Hyperspectral Microscopy for Detecting Nanoscale Particles in Environmental Nanotoxicology Research. *Sci. Total Environ.* **2021**, *772*, 145478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145478>.
- (53) Unsworth, L. D.; Tun, Z.; Sheardown, H.; Brash, J. L. Chemisorption of Thiolated Poly(Ethylene Oxide) to Gold: Surface Chain Densities Measured by Ellipsometry and Neutron Reflectometry. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *281* (1), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.022>.



- (54) Yoo, J.; Park, C.; Yi, G.; Lee, D.; Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>.
- (55) Conde, J.; Tian, F.; Hernández, Y.; Bao, C.; Cui, D.; Janssen, K. P.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Stoeger, T.; de la Fuente, J. M. In vivo Tumor Targeting via Nanoparticle-Mediated Therapeutic siRNA Coupled to Inflammatory Response in Lung Cancer Mouse Models. *Biomaterials* **2013**, *34* (31), 7744–7753. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.041>.
- (56) Ruoslahti, E. Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (28), 3747–3756. <https://doi.org/10.1002/adma.201200454>.
- (57) Hynes, R. O. Integrins. *Cell* **2002**, *110* (6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6).
- (58) Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Mas-Moruno, C.; Dorfner, P. M.; Polleux, J.; Guasch, J.; Conings, B.; Boyen, H. G.; Bochen, A.; Sobahi, T. R.; Burgkart, R.; Spatz, J. P.; Fässler, R.; Kessler, H. A Molecular Toolkit for the Functionalization of Titanium-Based Biomaterials That Selectively Control Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (28), 9218–9223. <https://doi.org/10.1002/chem.201301478>.
- (59) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (9), 1746–1755. <https://doi.org/10.1039/c0nr00104j>.
- (60) Vashist, S. K.; Zhang, B.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F.-S. Sulfo-N-Hydroxysuccinimide Interferes with Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Anal. Biochem.* **2011**, *417* (1), 156–158. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.045>.
- (61) Bao, C.; Beziere, N.; Del Pino, P.; Pelaz, B.; Estrada, G.; Tian, F.; Ntziachristos, V.; De La Fuente, J. M.; Cui, D. Gold Nanoprisms as Optoacoustic Signal Nanoamplifiers for in Vivo Bioimaging of Gastrointestinal Cancers. *Small* **2013**, *9* (1), 68–74. <https://doi.org/10.1002/sml.201201779>.
- (62) Yuan, H.; Fales, A. M.; Vo-Dinh, T. TAT Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced Intracellular Delivery and Efficient NIR Photothermal Therapy Using Ultralow Irradiance. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (28), 11358–11361. <https://doi.org/10.1021/ja304180y>.

## Capítulo 4

- (63) Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. *Nano Lett.* **2005**, 5 (4), 709–711. <https://doi.org/10.1021/nl050127s>.
- (64) Bardhan, R.; Lal, S.; Joshi, A.; Halas, N. J. Imaging and Treatment of Cancer. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (10), 936–946.
- (65) Le Goas, M.; Paquirissamy, A.; Gargouri, D.; Fadda, G.; Testard, F.; Aymes-Chodur, C.; Jubeli, E.; Pourcher, T.; Cambien, B.; Palacin, S.; Renault, J.-P.; Carrot, G. Irradiation Effects on Polymer-Grafted Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, 2 (1), 144–154. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00484>.
- (66) Patel, D.; James, K. T.; O'Toole, M.; Zhang, G.; Keynton, R. S.; Gobin, A. M.; O'Toole, M.; Zhang, G.; Keynton, R. S.; Gobin, A. M. A High Yield, One-Pot Dialysis-Based Process for Self-Assembly of near Infrared Absorbing Gold Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 441, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.029>.
- (67) Puertas, S.; de Gracia Villa, M.; Mendoza, E.; Jiménez-Jorquera, C.; de la Fuente, J. M.; Fernández-Sánchez, C.; Grazú, V. Improving Immunosensor Performance through Oriented Immobilization of Antibodies on Carbon Nanotube Composite Surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 43, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.010>.

# **Capítulo 5**

## **Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores.**



# **1. INTRODUCCIÓN**

Los péptidos han atraído un gran interés en el campo de la biomedicina como moléculas que pueden emular la funcionalidad de las proteínas y poseen un alto grado de modularidad en el diseño molecular.<sup>1</sup> Se pueden diseñar usando un enfoque *in silico* simulando las interacciones con los receptores de interés.<sup>2</sup> Además, se pueden obtener mediante métodos de síntesis baratos.<sup>3</sup> Alrededor de 60 fármacos basados en péptidos estaban aprobados en 2018 en los Estados Unidos, Europa y Japón, y más de 150 estaban desarrollo clínico,<sup>4</sup> datos que demuestran su potencial como fármacos. A pesar de los recientes avances, los péptidos también presentan una serie de inconvenientes como baja afinidad y selectividad de unión si se comparan con las proteínas, o una limitada estabilidad contra la proteólisis, que resulta en un tiempo de vida media muy corto en el tracto gastrointestinal y en suero.<sup>1</sup>

Para reducir estas desventajas, los péptidos se suelen unir a materiales no biológicos como compuestos moleculares, metales quelantes, polímeros e hidrogeles.<sup>5,6</sup> En el caso de la unión de los péptidos a nanopartículas (NP-pep), además de mejorar las funciones de los péptidos, se puede ampliar las funcionalidades del sistema y obtener efectos sinérgicos. El péptido podría dirigir la nanopartícula hacia la diana terapéutica mientras el material actúa como transportador de fármacos.<sup>7</sup>

En el Capítulo 3 ya se ha introducido el concepto de direccionamiento (*targeting*) y se ha descrito en qué consiste el direccionamiento pasivo debido al efecto EPR. Sin embargo, también existen estrategias para el direccionamiento activo de las nanopartículas a un sitio específico en el organismo. Para ello las nanopartículas se funcionalizan con alguna molécula que interaccione selectivamente con algún receptor específico de

## Capítulo 5

las células diana.<sup>8</sup> En la bibliografía encontramos numerosos ejemplos de direccionamiento activo de nanopartículas de oro con distintos tipos de péptidos.<sup>9,10</sup> Además, para favorecer su internalización en las células, las nanopartículas también se pueden funcionalizar con péptidos de penetración celular (CPP) que pueden dirigir las nanopartículas a orgánulos específicos como sucede con el péptido TAT y los endosomas.<sup>11</sup>

Asimismo, para explorar soluciones para cáncer y enfermedades cardiovasculares se utiliza la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD),<sup>12,13</sup> dicha cadena de aminoácidos se encuentra presente en ligandos biológicos que interaccionan con las células endoteliales involucradas en la angiogénesis. La secuencia RGD se descubrió por primera vez en la fibronectina, proteína de la matriz extracelular que promueve la adhesión celular. Desde entonces, la lista de ligandos que interaccionan con integrinas no ha parado de crecer.<sup>14</sup> Además de RGD, en la bibliografía se pueden encontrar otras secuencias, como el tripéptido leucina-aspartato-valina (LDV), que están presentes en ligandos como la VCAM (Molécula de Adhesión Vascular-1) y la fibronectina.<sup>15</sup>

Las integrinas son receptores celulares heterodiméricos compuestos de glicoproteínas transmembrana de tipo I unidas entre sí por interacciones no covalentes (Figura 1, A). Estas subunidades, también denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , poseen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.<sup>16</sup> Actualmente, se han identificado 24 pares  $\alpha\beta$  en mamíferos, que corresponden a 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  (Figura 1B).<sup>17</sup> Entre las funciones de las integrinas se encuentran la adhesión, la organización del citoesqueleto, la señalización mecánica, la migración, la proliferación y la diferenciación.<sup>18</sup> Las integrinas también intervienen en procesos patológicos como la inflamación, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la metástasis de tumores. Además, la unión a integrinas se ha

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

identificado como la principal vía de entrada de virus en la célula.<sup>19</sup> El papel de la integrinas en diferentes patologías, y su accesibilidad en la superficie celular hacen que estos receptores sean atractivos como dianas terapéuticas.<sup>20</sup>

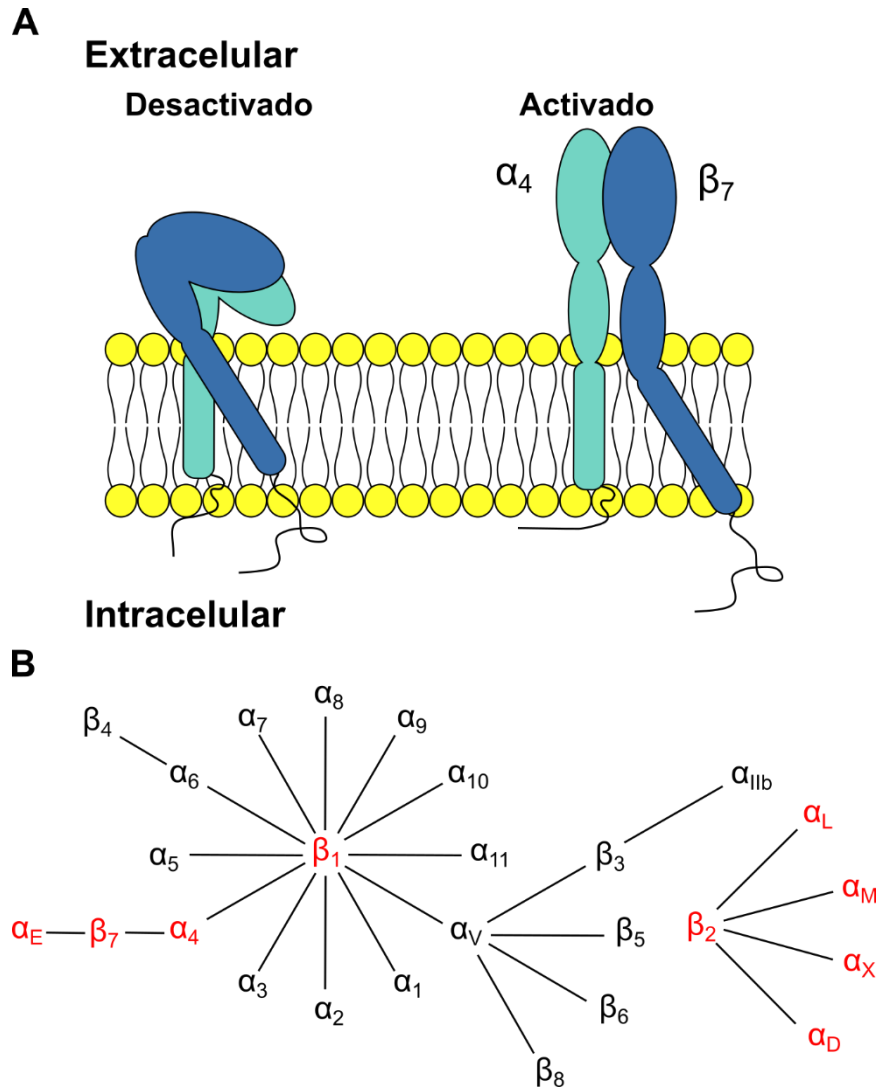


Figura 1. Representación de una integrina  $\alpha_4\beta_7$  en su forma inactiva y activa (A). Familia de integrinas: Se producen diversas asociaciones encontradas en mamíferos entre los 18 tipos de cadenas de integrina  $\alpha$  y los 8 tipos de cadenas integrina  $\beta$ , dando lugar a la formación de 24 integrinas. Las integrinas marcadas en rojo están expresadas en leucocitos (B).<sup>17</sup>

En el sistema inmune, las integrinas juegan un papel esencial en varios procesos como la adhesión de leucocitos a las células endoteliales. Las integrinas  $\alpha_4$  están expresadas en los linfocitos y la mayoría de los

## Capítulo 5

leucocitos.<sup>19</sup> Una de las funciones principales de estos receptores es atraer los leucocitos de la circulación periférica a los sitios de inflamación dentro del tejido mediante la adhesión a las células endoteliales y así propiciar transmigración de los leucocitos desde el vaso sanguíneo al tejido dañado (Figura 2).<sup>21</sup> La infiltración de leucocitos y linfocitos es el origen patológico de muchas enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn o el asma.<sup>20</sup>

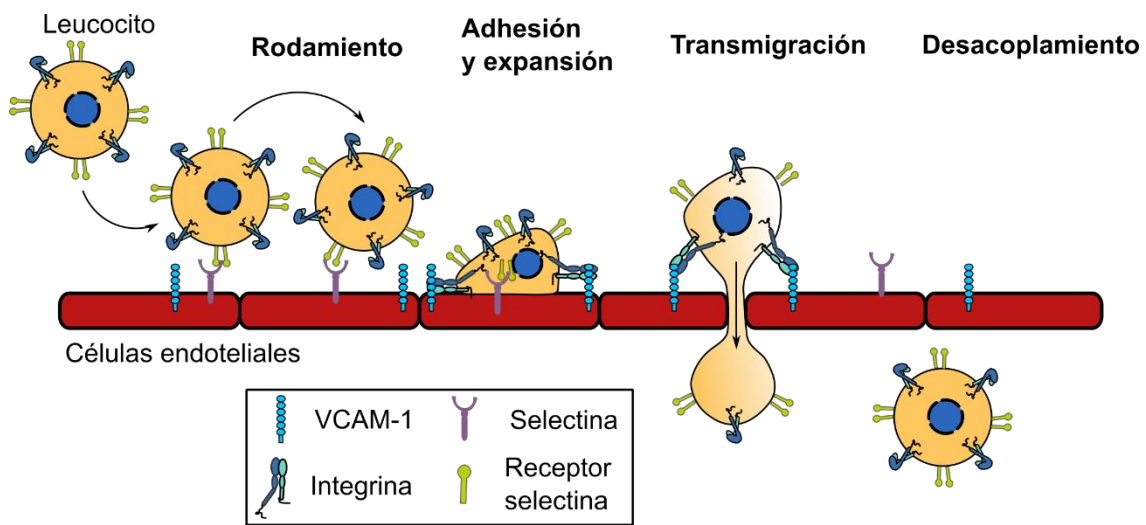


Figura 2. Proceso de interacción de los leucocitos a la células endoteliales a través de la unión a integrinas.<sup>17</sup> Las integrinas juegan un papel crucial en la cascada de reclutamiento. Inicialmente las selectinas de las células endoteliales interaccionan con los receptores de los leucocitos y se produce el rodamiento. Durante el rodamiento, la integrina se activa, y se adhiere al endotelio. En consecuencia, se produce una reorganización de su citoesqueleto, y el leucocito se expande sobre la superficie endotelial. Posteriormente, la célula se arrastra hasta encontrar un borde entre las células endoteliales y lo atraviesa. Finalmente, se produce el desacoplamiento del leucocito sobre las células endoteliales.

La familia de integrinas  $\alpha_4$  incluye una de las integrinas más expresadas,  $\alpha_4\beta_1$  y otra integrina más especializada,  $\alpha_4\beta_7$ . La integrina  $\alpha_4\beta_1$ , también conocida como VLA-4 (*Very Late Antigen-4*), está expresada en la superficie de los linfocitos y de la mayoría de los leucocitos, excepto los neutrófilos.<sup>19</sup> Los ligandos primarios de  $\alpha_4\beta_1$  se dividen en endoteliales



## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

VCAM-1 y en glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM) como fibronectinas. La integrina interacciona con VCAM-1 a través del sitio activo QID(40)SPL donde el aspartato 40 parece ser esencial para la unión al ligando. Mientras que la interacción con ECM ocurre a través de la secuencia LDV del segmento conector-1 (CS-1) de la fibronectina.<sup>20</sup>

De forma similar, la integrina  $\alpha_4\beta_7$  se expresa sobre la superficie de los leucocitos y linfocitos. La interacción de la integrina con VCAM-1 y fibronectina ocurren a través del mismo epítipo como en la integrina  $\alpha_4\beta_1$ , aunque la afección para VCAM-1 es considerablemente más baja. Además,  $\alpha_4\beta_7$  se une a la molécula de adhesión celular de adreína mucosa-1 (MadCAM-1).<sup>22</sup>

Se plantea que las integrinas  $\alpha_4$  pueden ser una buena diana terapéutica para realizar un ensayo de selectividad de nanopartículas para terapia fototérmica. Si a estas nanopartículas se les unen péptidos específicos pueden generar una plataforma prometedora para un amplio rango de aplicaciones biomédicas.<sup>23</sup> Gentilucci y su grupo han desarrollado una serie de péptidos y peptidomiméticos<sup>24,25</sup> que presentan los epítipos mínimos de los ligandos VCAM-1 y MadCAM-1 que interaccionan con diversas integrinas,  $\alpha_4\beta_1$ , y  $\alpha_4\beta_7$ . También, se han preparado dos péptidos que nos servirán como controles, que tienen como objetivo la integrina  $\alpha_v\beta_3$  y la cadherina-E. Se planea la conjugación de los péptidos con nanopartículas para obtener multifuncionalidad y mayor estabilidad del péptido frente a la proteólisis.

En primer lugar, se funcionalizarán nanoesferas de 14 nm con 6 péptidos de ligandos que interaccionan con receptores celulares. Después se evaluará la eficacia del direccionamiento con dos líneas celulares, una que exprese la integrina adecuada y otra, de control, que no la exprese. Por último, los péptidos más eficaces se conjugarán sobre nanoprismas para su

## Capítulo 5

aplicación en experimentos de fototermia *in vitro*. En esto se resalta la importancia de los nanoprismas preparados en el Capítulo 4, NPrs-GSH-PEG, que no internalizaban en las células Vero y creemos que pueden ser un candidato prometedor para terapias que requieran una mayor selectividad y evitar interacciones inespecíficas con receptores biológicos. Como beneficio añadido, se reduce el uso excesivo del material que podría originar una respuesta inmunitaria.<sup>26</sup>

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.1 Funcionalización de nanoesferas con péptidos**

La preparación de los péptidos se realiza mediante síntesis en fase sólida por el grupo de Luca Gentilucci (Universidad de Bolonia).<sup>27</sup> Dicho grupo prepara una serie de péptidos que derivan de los ligandos VCAM-1 y MadCAM-1 que interaccionan con la familia de las integrinas  $\alpha_4$  (Figura 3). Los epítomos mínimos de VCAM-1 y de MadCAM capaces de interaccionar con dichas integrinas son las secuencias isoleucina-aspartato-serina (IDS) y leucina-aspartato-valina (LDV) respectivamente.<sup>28</sup> Por otro lado, la secuencia RGD cíclica (EQ20A) se ha utilizado para tratar células con la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que está sobreexpresada en células endoteliales activas y en algunos tumores sólidos.<sup>29</sup> La secuencia RGD lineal se ha usado en el Capítulo 4 para favorecer la entrada de los NPRs en células Vero. Finalmente, la secuencia aspartato-triptófano-valina-isoleucina (DWVI) tiene como diana otro tipo de receptores de adhesión que se conocen como cadherinas<sup>30</sup> y al igual que el péptido RGD nos funcionará como control porque no esperamos diferencias en la expresión de estos receptores.

## Capítulo 5

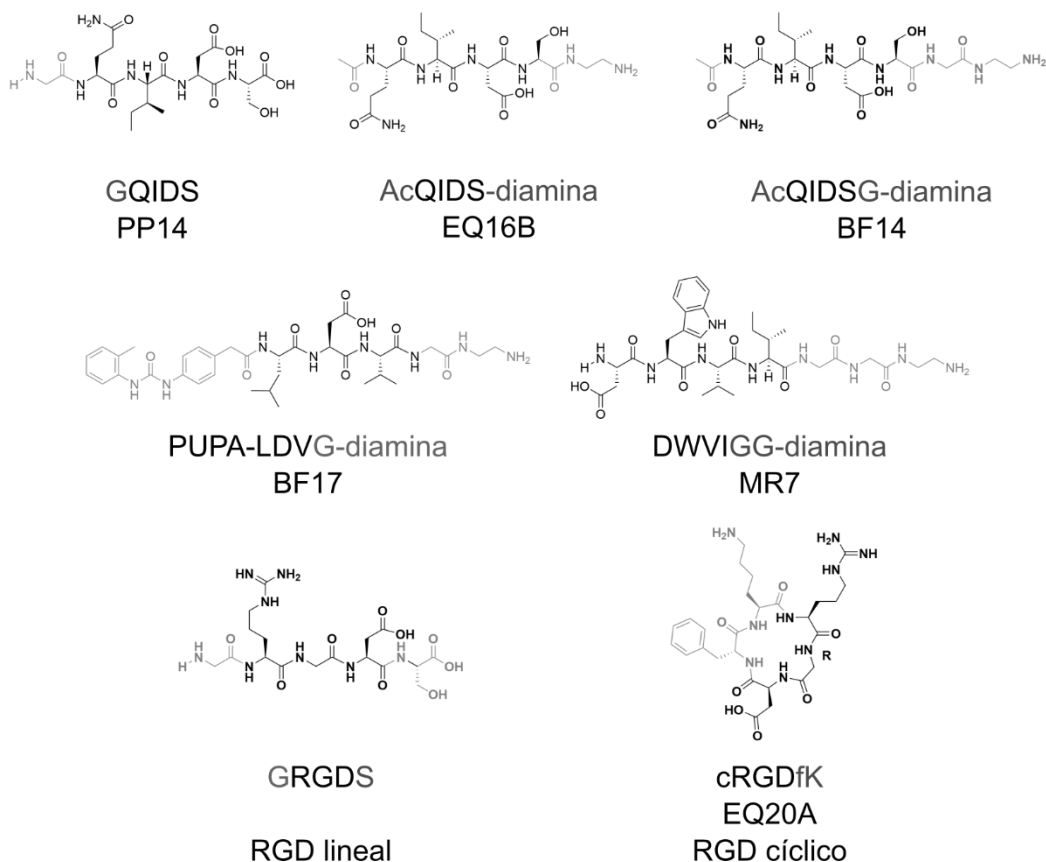


Figura 3. Péptidos que interaccionan con diferentes integrinas sintetizados por fase sólida. Se pueden dividir en cuatro tipos de secuencias: isoleucina-aspartato-serina (IDS), leucina-aspartato-valina (LDV), arginina-glicina-aspartato (RGD) y aspartato-triptófano-valina-isoleucina (DWVI). La secuencia IDS es el epítipo mínimo de la molécula VCAM que interacciona con la integrina  $\alpha_4\beta_1$ . Mientras que la secuencia LDV procede de la molécula MadCAM e interacciona con las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$ . Asimismo, la secuencia RGD se utiliza para tratar células que sobreexpresen la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Finalmente, la secuencia DWVI es capaz de interaccionar con cadherinas y se utilizará como control.

Se seleccionan las nanopartículas estabilizadas con el PEG corto, NS-PEG458, para que los péptidos se encuentren más expuestos e interaccionen con los receptores celulares. En los capítulos 2 y 3 se evidenció el efecto de la hidrofobicidad de la doxorrubicina que limitaba el uso del PEG 458 porque las nanopartículas no eran estables. No obstante, la mayoría de los péptidos que se utilizan no presenta grupos apolares o cargas positivas (ausencia de lisinas o argininas) y no deberían comprometer la estabilidad de las nanopartículas al disminuir su carga neta. Sin embargo, es de esperar que el

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

péptido EQ20A disminuya la estabilidad de la nanopartícula debido a la presencia de cargas positivas en los aminoácidos de lisina y arginina.

Para la funcionalización de las nanopartículas con los péptidos se aplica el acoplamiento con carbodiimida, que consiste en la activación de los grupos carboxilos por reacción con EDC y sulfo-NHS en MES 10 mM a pH 6 y su posterior reacción con los péptidos a pH básicos (pH 8-9). No es posible cuantificar los péptidos por las técnicas tradicionales de determinación de proteínas como Bradford o BCA (ensayo del ácido bicinconínico), ya que la sulfo-NHS interfiere en la cuantificación.<sup>31</sup> Sin embargo, el péptido MR7 presenta un triptófano cuya fluorescencia se puede utilizar para cuantificar indirectamente la cantidad de MR7 que se ha unido a las NS. Se mide la fluorescencia del péptido en el sobrenadante de la funcionalización y de esta manera se obtiene la cantidad de péptido que no se ha unido. Esto nos permite utilizar la funcionalización de las NSs con MR7 para optimizar las condiciones de la reacción para después aplicar las mismas condiciones al resto de peptidomiméticos.

El pH juega un papel muy importante en la reacción de acoplamiento del péptido a los grupos carboxilatos activados sobre la nanopartícula. Si el pH es próximo a 7, la reacción puede no ocurrir puesto que la mayor parte de los grupos amino están protonados y, por tanto, son poco nucleófilos. Por otro lado, el éster de sulfo-NHS no es estable a pH básico y se puede hidrolizar. En consecuencia, se lleva a cabo una optimización para elegir el pH de la reacción tras la activación. Se usan pH superiores a 7 para la unión del péptido al grupo amino del carbono terminal. Se eligen dos valores de pH (pH 8 y 9) para la reacción y tres tampones para obtener dichos pH: carbonato (pH 9), fosfato (pH 8) y borato (pH 8 y 9). En la Figura 4, se observa que el cambio de tampón no afecta a la unión específica del péptido, uniéndose covalentemente en ambos casos en torno al 56% (385 péptido/NP)

## Capítulo 5

del péptido a pH 8. Por otro lado, cuando la nanopartícula no se activa con EDC, la interacción del péptido con la nanopartícula es completamente inespecífica debida a enlaces iónicos u otro tipo de interacciones no covalentes, y se aprecia que este tipo de interacción se rompe más fácilmente con el tampón borato que con el tampón fosfato de sodio. En el caso de la funcionalización a pH 9, el rendimiento se ve reducido hasta menos de un 40% tanto para carbonato como borato. A este pH, las interacciones inespecíficas son menores del 20% con respecto al péptido añadido. Teniendo en cuenta los resultados se utilizará tampón borato a pH 8 para el resto de las funcionalizaciones.

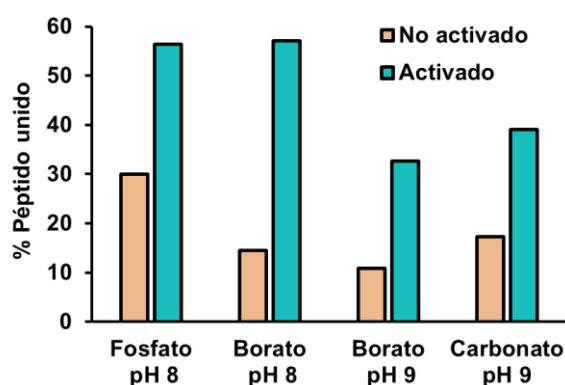


Figura 4. Rendimientos de la funcionalización de las NS-PEG458 con el péptido MR7 usando tres tampones diferentes (fosfato, borato y carbonato) y dos pH (8 y 9) de trabajo.

Se repite el procedimiento para el resto de los péptidos y se caracterizan por espectroscopía UV-Vis, DLS, gel de electroforesis, y potencial-  $\zeta$  (Figura 5). El espectro de las nanopartículas se mantiene prácticamente inalterado después de la funcionalización para todos los péptidos, produciéndose solo pequeños desplazamientos de la banda de LSPR de las NPs comparada con las iniciales mientras que el coeficiente de

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

estabilidad<sup>a</sup> se mantiene alrededor de 4. En la Figura 5, A se presenta el espectro de las NS-PEG458 y NS-PEG458-MR7 donde no se produce desplazamiento de la longitud de onda de LSPR manteniéndose en un valor de 521 nm.

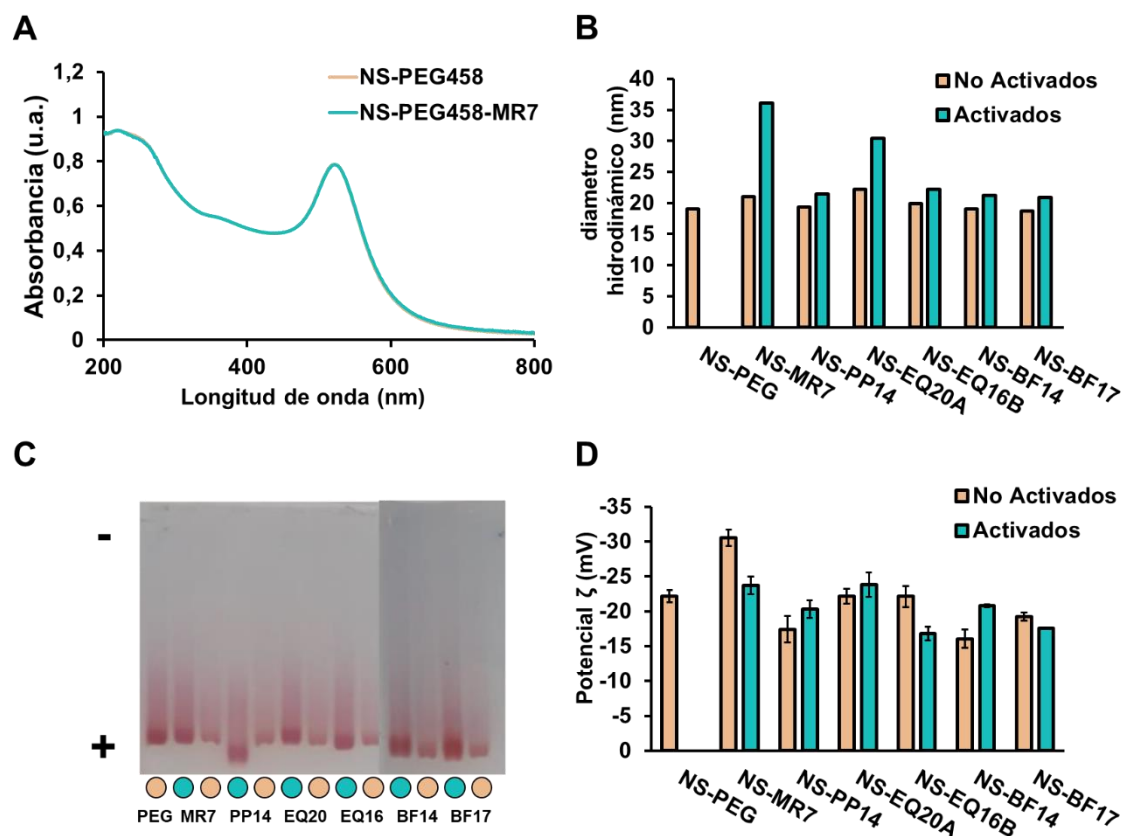


Figura 5. Caracterización de las NS-PEG458-pep por espectroscopía UV-vis (A), DLS (B), gel de electroforesis (C) y potencial  $\zeta$  (D).

Por otro lado, se determina el diámetro hidrodinámico para conocer el estado de agregación de las nanopartículas. Para comparar las posibles interacciones de los péptidos sobre la nanopartícula, se comparan las NS-PEG458-pep con los controles sin activar con EDC y sulfo-NHS. Se comprueba que el péptido no afecta a la estabilidad de la nanopartícula

<sup>a</sup> Coeficiente de estabilidad es la relación de la absorbancia en el máximo del plasmón de superficie y la absorbancia a 600 nm, que dan información del estado de dispersión de la muestra

## Capítulo 5

cuando no existen interacciones covalentes. El diámetro hidrodinámico se mantiene alrededor de 15 nm (Figura 5, B). Sin embargo, al funcionalizar covalentemente la superficie con la mayoría de los péptidos, se produce un aumento del diámetro hidrodinámico a valores de 20,9-22,2 nm, lo que puede indicar que la funcionalización se ha producido y el péptido afecta a la conformación del recubrimiento de la nanopartícula. En el caso de las NS-PEG458-MR7 y NS-PEG458-EQ20A, el aumento del diámetro es más drástico y se obtienen valores de 36,1 nm, y 30,4 nm respectivamente. Este aumento del diámetro se puede deber a que los péptidos afecten a la estabilidad de las nanopartículas por los grupos hidrofóbicos (fenilalanina y triptófano).

El gel de electroforesis también puede utilizarse como herramienta para conocer el éxito de la funcionalización como se ha visto en otros casos. En la Figura 5, C se observa que tras derivatizarse con los péptidos las nanopartículas no sufren cambios relevantes en los desplazamientos electroforéticos si se compara con las NS-PEG458 y los controles sin activar. Esto se debe a que los péptidos son pequeños y la cantidad de grupos carboxilos que se funcionalizan es baja, un 10%, que equivale a 300 péptidos/NP. Esta tendencia es diferente para NS-PEG458-PP14, que es el único péptido que presenta dos grupos carboxilos por lo que al funcionalizar el péptido a los grupos carboxilos, la carga de la nanopartícula se incrementa y también su movilidad electroforética.

Tras los resultados de cuantificación del péptido MR7 por fluorescencia y las leves modificaciones en el DLS y el potencial  $\zeta$ , se puede concluir que los péptidos están unidos a las nanopartículas y el siguiente paso que se propone es la realización de ensayos *in vitro*. En la siguiente sección, se seleccionarán las células que presenten la integrina  $\alpha_4$  y se estudiará la internalización de las nanopartículas preparadas en estas líneas celulares.



### 2.2 Experimentos *in vitro* de nanoesferas con células en suspensión

#### 2.2.1 Selección de las líneas celulares

Para los experimentos *in vitro*, se busca una línea celular que sea del sistema inmune, relevante para los procesos de adhesión e infiltración/transmigración asociados a la inflamación. Entre las líneas celulares posibles seleccionaremos una línea que exprese las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$  y otra similar que no las exprese o lo haga en menor medida. Las células Jurkat, línea ampliamente utilizada en experimentación, son linfocitos T inmortalizados que fueron obtenidos de la sangre periférica de un niño con leucemia de las células T. Se ha extendido su uso como modelo de cáncer de leucemia para estudiar señalización celular, expresión de receptores de citoquina y para el efecto de radiación y otros fármacos.<sup>32,33</sup> Muchos trabajos se han centrado en el uso de estas células para estudiar la liberación de fármacos contra la leucemia como el paclitaxel encapsulados en diferentes formulaciones poliméricas.<sup>34</sup> Asimismo, otros grupos han demostrado que esta línea cuenta con la subunidad  $\alpha_4$  presente en las integrinas de interés.<sup>35,36</sup>

Por otro lado, es interesante evaluar si la posible internalización que tendrán las NPs es debida a la integrina o los péptidos están interaccionando con otros receptores. Para ello, se selecciona una línea que no presente estas integrinas y tenga ciertas características similares a las Jurkat, ya que son células en suspensión. Se selecciona la línea celular EL4, que son linfocitos T de ratón.

Para confirmar la presencia de las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$  en ambas líneas celulares, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Se selecciona un anticuerpo anti- $\alpha_4$  que interaccione con dicha subunidad dado que ambas integrinas la presentan. Para medir la fluorescencia de las células que tienen

## Capítulo 5

este receptor, se utiliza un citómetro de flujo. Esta técnica permite medir simultáneamente múltiples características ópticas (dispersión de luz y fluorescencia) de cada una de las células o partículas presentes en una suspensión.<sup>37</sup> En alguna ocasión, el anticuerpo puede unirse inespecíficamente a la superficie celular o a las proteínas citoplasmáticas, produciendo falsos positivos. Para controlar este posible artefacto, se usan los controles de isotipo, que son anticuerpos de la misma clase del que usamos, y con el mismo fluorocromo, pero diseñados para reconocer moléculas que no están presentes en la célula. De esta manera conocer las posibles uniones inespecíficas (Figura 6).<sup>38,39</sup>

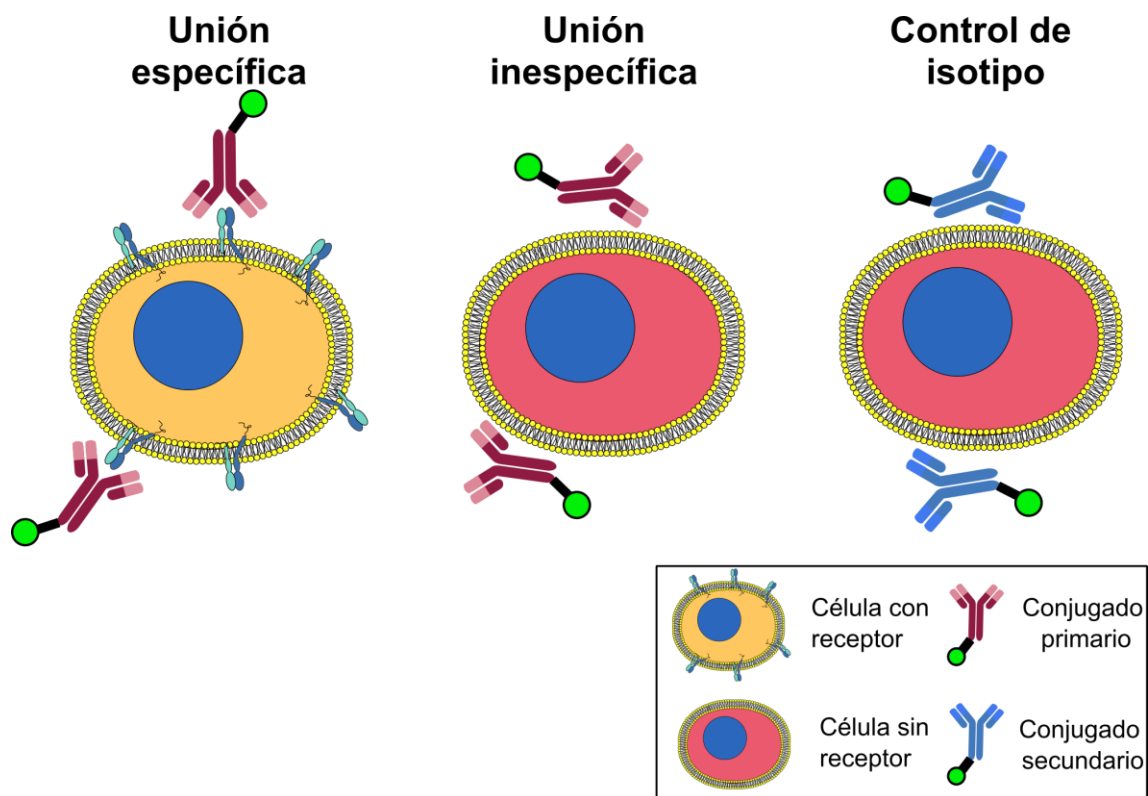


Figura 6. Representación del ensayo de control de isotipo. Se utilizan dos anticuerpos, anticuerpo específico fluorescente de la proteína de la célula, que solo debería marcar cuando esté presente dicha biomolécula. Para comprobar las posibles interacciones inespecíficas se utiliza un anticuerpo de características similares pero que no tenga afinidad por esta proteína.

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

Tanto las células EL4 como las Jurkat se incuban con el anticuerpo y el control de isotipo a dos concentraciones diferentes (0,1 y 0,5  $\mu\text{g Ab}/10^6$  células) durante 30 min a 37 °C. Se seleccionan dos concentraciones para asegurarnos que se utiliza el suficiente anticuerpo para la interacción con las integrinas. A continuación, se lavan y resuspenden en DPBS. Las células tratadas se pasan por el citómetro de flujo.

En la Figura 7, se muestran los resultados de la citometría de flujo. En el caso del control de isotipo, no se produce desplazamiento de la señal y en ambas líneas es negativa la unión (Figura 7, A-B). Este resultado nos permite descartar que se produzca un falso positivo en el ensayo de inmunofluorescencia. Cuando se utiliza el anticuerpo anti- $\alpha_4$ , se produce un desplazamiento de la señal en las células Jurkat (Figura 7, D) que no se observa en las EL4 (Figura 7, C). Un aumento de la concentración no afecta a la interacción del anticuerpo con las células.

El experimento confirma que las células Jurkat expresan la subunidad  $\alpha_4$  presente en las integrinas de interés. Por lo que, es una línea celular adecuada para evaluar la idoneidad de los péptidos para el direccionamiento. Asimismo, el resultado con las células EL4 muestra que no expresan dicha subunidad. Por lo tanto, la ausencia de la integrina junto a otras características que sí son similares a las Jurkat, hace que las EL4 sean adecuadas como control en los experimentos de direccionamiento.

## Capítulo 5

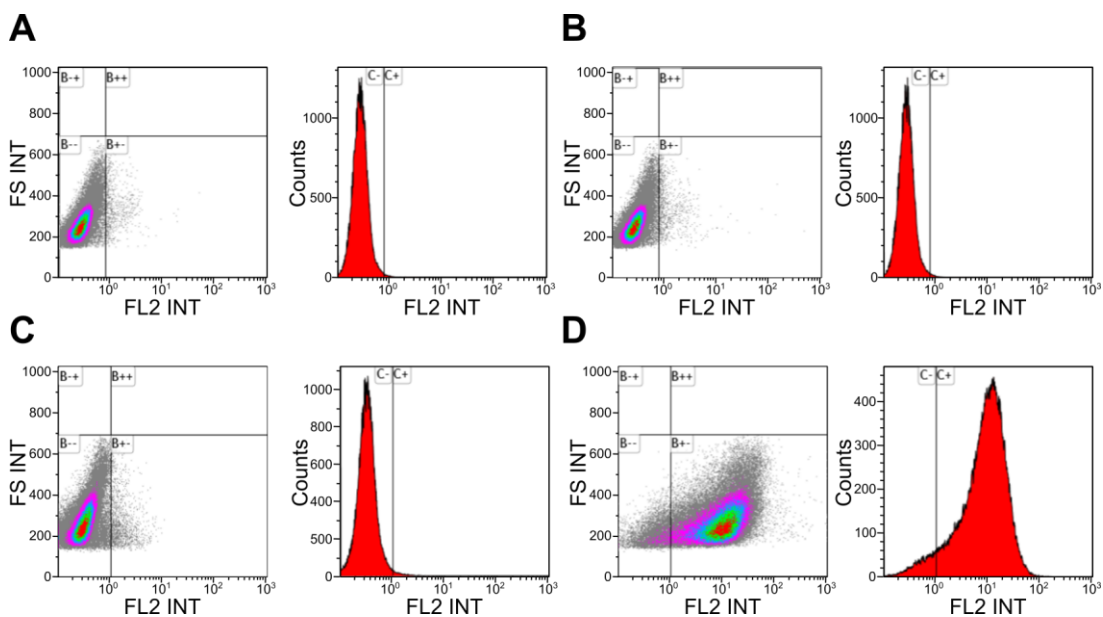


Figura 7. Resultados de citometría para la integrina  $\alpha_4$  (A) y (C) son los controles de isotipo para las células EL4 y Jurkat respectivamente, (B) y (D) son las células incubadas con el anticuerpo marcado anti-integrina  $\alpha_4$ .

### 2.2.2 Estudios de internalización de nanoesferas funcionalizadas con péptidos en linfocitos T

Se determina la citotoxicidad de las nanoesferas funcionalizadas con los péptidos en las líneas celulares Jurkat y EL4. Las células se incuban durante 24 h con las nanopartículas a una concentración de 6 nM. La viabilidad celular se determina por azul de tripano, que es un ensayo simple para determinar el número de células viables en una suspensión aprovechando las características de estas células. El principio del ensayo se basa en que las células vivas presentan una membrana celular intacta que excluye el colorante por lo que no se tiñen. Sin embargo, en las células muertas la membrana está dañada y el citoplasma se tiñe de color azul.<sup>40</sup> De acuerdo con este ensayo la viabilidad de ambas líneas celulares se mantiene por encima de un 90%, obteniéndose valores semejantes a los controles (Figura 8) y se concluye que esta concentración es adecuada para futuros ensayos *in vitro*.

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

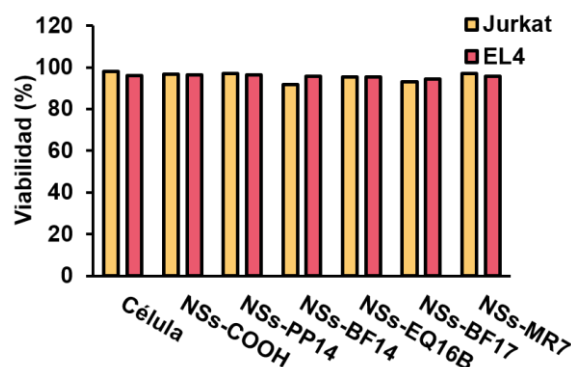


Figura 8. Viabilidad de las células Jurkat y EL 4 por azul de tripano en presencia de 6 nM de NS-PEG458-pep y los diferentes NS-PEG458-pep que se han incubado durante 24h.

Posteriormente, se evalúa la capacidad de interacción de estas nanopartículas con las dos líneas celulares por microscopía de campo oscuro. Las células EL4 y Jurkat se incuban con NS-PEG458-pep a 6 nM durante 24 h. Las nanopartículas que no hayan interaccionado con la célula se retiran mediante lavados por centrifugación. Para la visualización por microscopía de fluorescencia, se necesita inmovilizar las células en el cubreobjeto puesto que son en suspensión. La inmovilización se realiza mediante tratamiento previo del cubreobjeto con una disolución de poli-L-lisina (PLL). PLL es un polipéptido policationico que se usa ampliamente para la inmovilización inespecífica de células mediante la interacción electrostática de la membrana celular y la carga positiva del recubrimiento.<sup>41</sup> Una vez inmovilizadas, las células se fijan con paraformaldehído y sus núcleos se tiñen con DAPI repitiendo el mismo protocolo que para células adherentes.

En la Figura 9 se presentan los resultados de microscopía de campo oscuro para ambas líneas celulares. En las muestras tratadas con NS-PEG458 se aprecia dispersión de la luz que puede deberse a agregados de NPs en el medio que no se han podido eliminar durante los lavados o bien que se dan interacciones inespecíficas de las células con las NS. Al tratar las células con las NS-PEG458-MR7, se produce internalización de las nanopartículas en ambas líneas celulares. Este resultado es consistente con la bibliografía, ya

## Capítulo 5

que la cadherina E se presenta en la mayoría de las membranas celulares.<sup>42</sup> Esto se explica por la necesidad de las células T para reconocer el tejido sólido. En el caso del péptido con la secuencia RGD cíclica (NS-PEG458-EQ20A) no se produce internalización. Es un resultado inesperado porque suele dar buenos resultados en la internalización de células que expresen la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>29</sup> Es probable que la baja estabilidad de la nanopartícula, que se observó por DLS (Figura 5, B), impida que interaccione adecuadamente con el receptor.

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

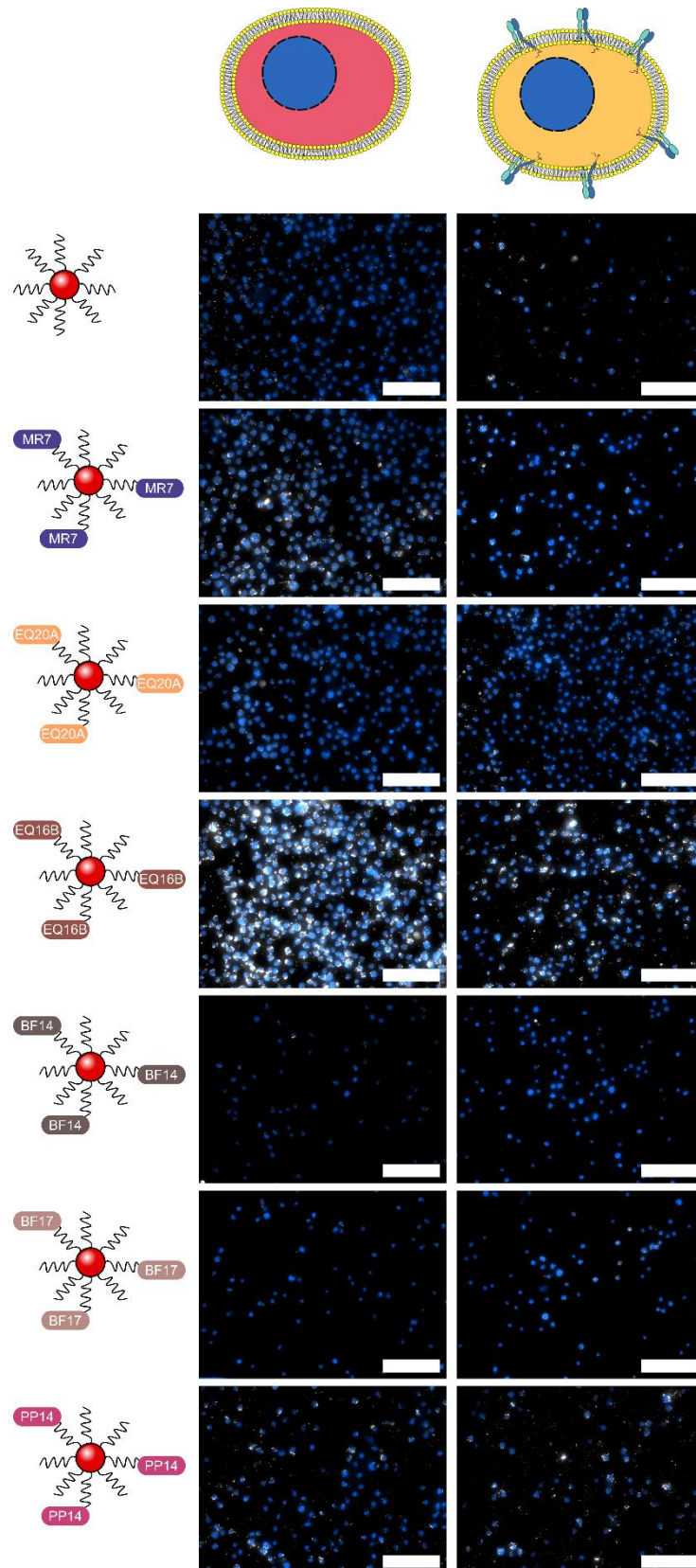


Figura 9. Imágenes de microscopía de campo oscuro de células EL4 (izquierda) y Jurkat (derecha) que se han incubado con NS-PEG458-pep a 6 nM durante 24h. Los núcleos celulares se tiñeron con diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las barras de escala corresponden a 50 µm.

## Capítulo 5

Con respecto a los péptidos de la integrina  $\alpha_4$ , las secuencias QIDS y LDV, las nanopartículas funcionalizadas con el LDV (NS-PEG458-BF17) presentan una baja internalización. Estos resultados son contrarios a un trabajo previo del grupo de Luca Gentilucci. En este estudio se comparaba la adhesión de células Jurkat con células HEK-293 en superficies de zeolitas. Las superficies se funcionalizaron con los péptidos que presentan las secuencias QIDS y LDV. Observaron que cuando usaba la secuencia LDV la inmovilización de las células Jurkat fue mayor en la superficie de zeolita.<sup>24</sup> Nuestro resultado se podría explicar porque la cantidad de péptido en cada nanopartícula no es suficiente para producir la interacción con la célula, o que la presentación del péptido no sea la adecuada cuando está unido a las nanopartículas de oro.

En el caso de las secuencias QIDS, tanto BF14 como EQ16B se unen por un grupo amino en el extremo del carbono terminal, y solo se diferencian en la presencia de un residuo glicina adicional en el péptido BF14. La presencia de este aminoácido disminuye considerablemente la internalización de las nanopartículas en las células Jurkat, que es alta para NS-PEG458-EQ16B y apenas se observa para NS-PEG458-BF14. Por otro lado, para NS-PEG458-PP14, en el que la secuencia QIDS se une a través del extremo amino N terminal con una glicina de espaciador, se observa *a priori* una mayor internalización en las células Jurkat que en las EL4.

Sin embargo, las conclusiones de la microscopía de campo oscuro se deben analizar con cuidado ya que depende mucho de la preparación de las muestras y la eliminación de las nanopartículas del medio. Por lo que se optó por confirmar este resultado mediante una técnica más cuantitativa, Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). ICP-MS permite cuantificar la cantidad de oro por célula y así poder comparar los resultados de microscopía. Las células se incuban durante 24 h



## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

con las nanopartículas funcionalizadas con los diferentes péptidos a 6 nM. Tras la incubación, se retiran las nanopartículas que no han interaccionado y las células se tratan con medio ácido fuerte para descomponer las nanopartículas, y determinar la cantidad de Au (III). Además, como sabemos la cantidad de células, se puede determinar la cantidad de oro por célula para analizar posibles diferencias.

Los resultados muestran que se produce una mayor internalización en las células Jurkat (Figura 10, B), de hasta 10 veces más comparado con la internalización en células EL4 (Figura 10, A). Este resultado puede deberse a una mayor captación celular pero no se corresponde a lo observado en la microscopía de campo oscuro. Así que nos decantamos más por una posible agregación de las nanopartículas, que parece mayor en el medio de las células Jurkat, RPMI, si se compara con el medio DMEM, que se utiliza para las células EL4. La agregación no se percibe en las imágenes de microscopía al tratarse de una técnica de observación más localizada. Ante esta agregación no se pudieron confirmar los resultados de microscopía para las células Jurkat.

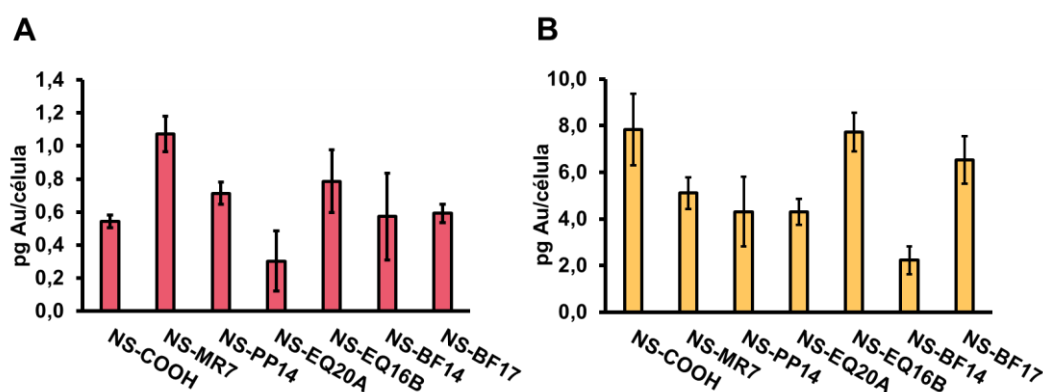


Figura 10. Cantidad de NS-PEG458-pep internalizadas por las células EL4 (A) y Jurkat (B) después de 24 h de la incubación con NS-PEG458-pep a 6 nM. La cuantificación de oro se mide por Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

## Capítulo 5

En el caso de las células EL4 (Figura 10, A), se produce mayor internalización para NS-PEG458-MR7. El resultado es coherente con las observaciones de microscopía de campo oscuro y se podría explicar por la presencia de cadherina-E en la membrana de las células EL4. Se ha descartado la presencia de las integrinas con la subunidad  $\alpha_4$  por la baja internalización de estas nanopartículas. NS-PEG458-PP14 y NS-PEG458-EQ16B se internalizan ligeramente mejor que el control, mientras que NS-PEG458-BF14, NS-PEG458-EQ20A y NS-PEG458-BF17 no internalizan dentro de la célula tal como se esperaba después de los resultados de microscopía. Ante estos resultados nos centraremos en los péptidos PP14 y EQ16B para ver su internalización con NPRs, y comprobar si se observa alguna diferencia en nuestros modelos celulares.

### **2.3 Experimentos *in vitro* de nanoprismas con células en suspensión**

#### **2.3.1 Estudio de internalización de nanoprismas funcionalizados con péptidos en linfocitos T**

En el Capítulo 4, se funcionalizaron los M-NPrs-GSH-PEG con la secuencia Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (RGD lineal, GRGDS en la Figura 3) para utilizarlos como transductores térmicos en células Vero y MCF-7 que son células adherentes. Estos experimentos nos permitieron optimizar las condiciones de láser para aplicarlas en los ensayos con linfocitos T. Sin embargo, como se ha mencionado, las células Jurkat y EL4 son células en suspensión. Para retirar el exceso de nanopartículas que no ha internalizado es necesario hacer lavados por centrifugación. Este cambio metodológico podría dificultar la idoneidad de los experimentos. Durante los lavados se pueden perder células o no separar adecuadamente los nanoprismas de las células (Figura 11).

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

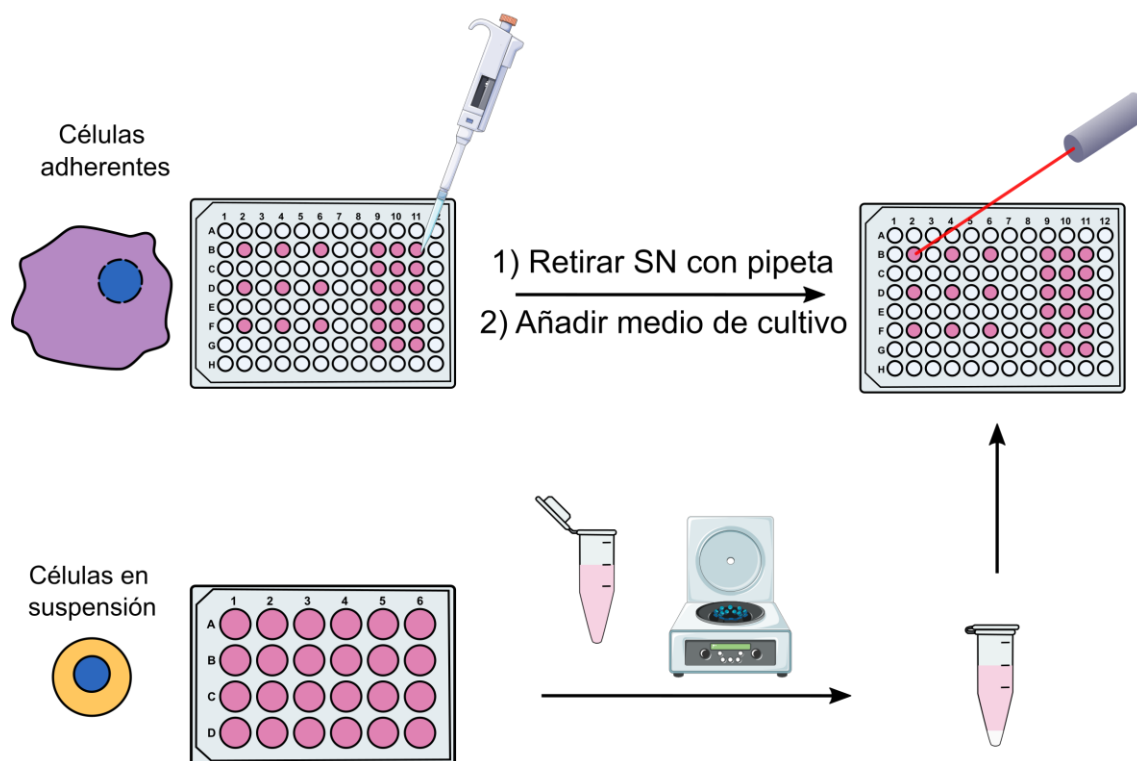


Figura 11. Esquema de trabajo marcando las diferencias de trabajar con células adherentes (arriba) y suspensión (abajo). Con células adherentes se pueden hacer lavados simplemente retirando el sobrenadante del pocillo. En cambio, para las células en suspensión se requiere centrifugar las células y en este paso podrían precipitar los nanoprismas. En consecuencia, se necesitan varios lavados para retirar todos los nanoprismas.

M-NPrs-GSH-PEG no se internalizaron en las células por lo que es una buena herramienta para comprobar la capacidad de direccionamiento de los péptidos. Mientras, los M-NPrs-GSH-PEG-RGD no deberían presentar grandes diferencias en la internalización en las células EL4 y Jurkat. Se funcionalizan los M-NPrs-GSH-PEG con los péptidos PP14 y EQ16B utilizando las mismas cantidades que para la funcionalización con RGD. Los nanoprismas funcionalizados se caracterizan por espectroscopía UV-vis-NIR y gel de electroforesis. En la Figura 12, A se muestran los espectros de los M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-PP14, en los que no se observa la presencia de agregados, ni desplazamiento de la banda de LSPR cuyo máximo se mantiene en el intervalo 1120-1140 nm para todas las nanopartículas funcionalizadas. Como en el caso de las nanoesferas, la

## Capítulo 5

cantidad de péptido unida a las nanopartículas no se puede cuantificar debido a la interferencia de la sulfo-NHS comentada en la sección 2.1.1. Por gel de electroforesis se produce una reducción de la movilidad electroforética de los NPrs cuando están funcionalizados con los péptidos (Figura 12, B). Sorprende que M-NPrs-GSH-PEG-PP14 no presente más movilidad tal como se observó en NS-PEG458-PP14 (Figura 5, C).

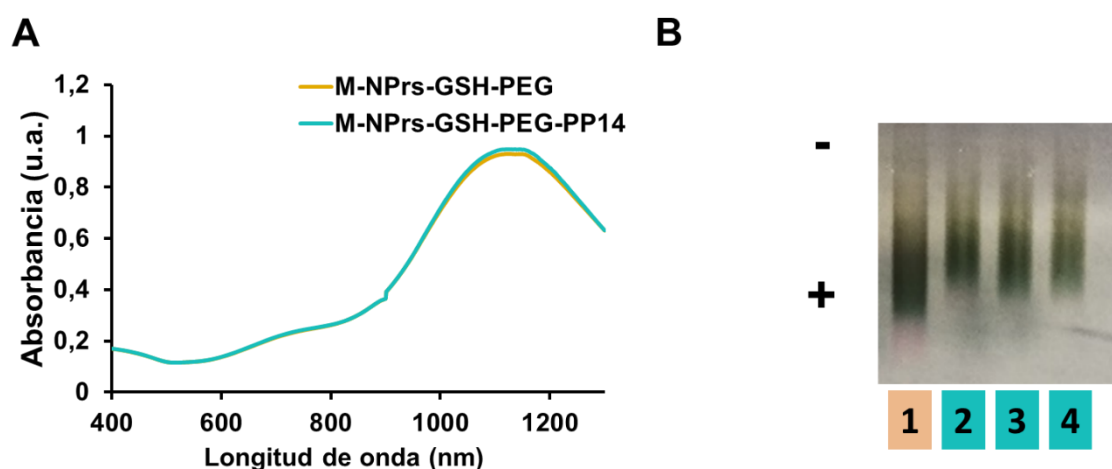


Figura 12. Caracterización de los nanoprismas funcionalizados con los péptidos por Espectro UV-vis-NIR de los M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-PP14 (A) Gel de electroforesis comparativo de (1) NPrs-GSH-PEG, nanoprismas derivatizados con (2) RGD (M-NPr-GSH-PEG-RGD), (3) PP14 (M-NPr-GSH-PEG-PP14) y (4) EQ16B (M-NPr-GSH-PEG-EQ16B) (4) (B).

Para comprobar la internalización de los péptidos en las células Jurkat y EL4, se realiza el ensayo de microscopía de campo oscuro incubando las líneas celulares con los NPrs a  $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  durante 24h (Figura 13). Tal como se esperaba los M-NPrs-GSH-PEG no internalizan en ninguna de las dos líneas celulares. Mientras que M-NPrs-GSH-PEG-RGD internalizan de manera considerable en las células EL4, y un poco menos en las células Jurkat. Tal vez porque estas última presenten una menor cantidad de integrina  $\alpha_v\beta_3$ . En el caso de los péptidos, para M-NPrs-EQ16B no se aprecia internalización, y solo se observan NPrs alrededor de los núcleos con los M-

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

NPrs-PP14 en las células Jurkat. Esto podría indicar que este péptido funciona mejor en la línea celular con la integrina.

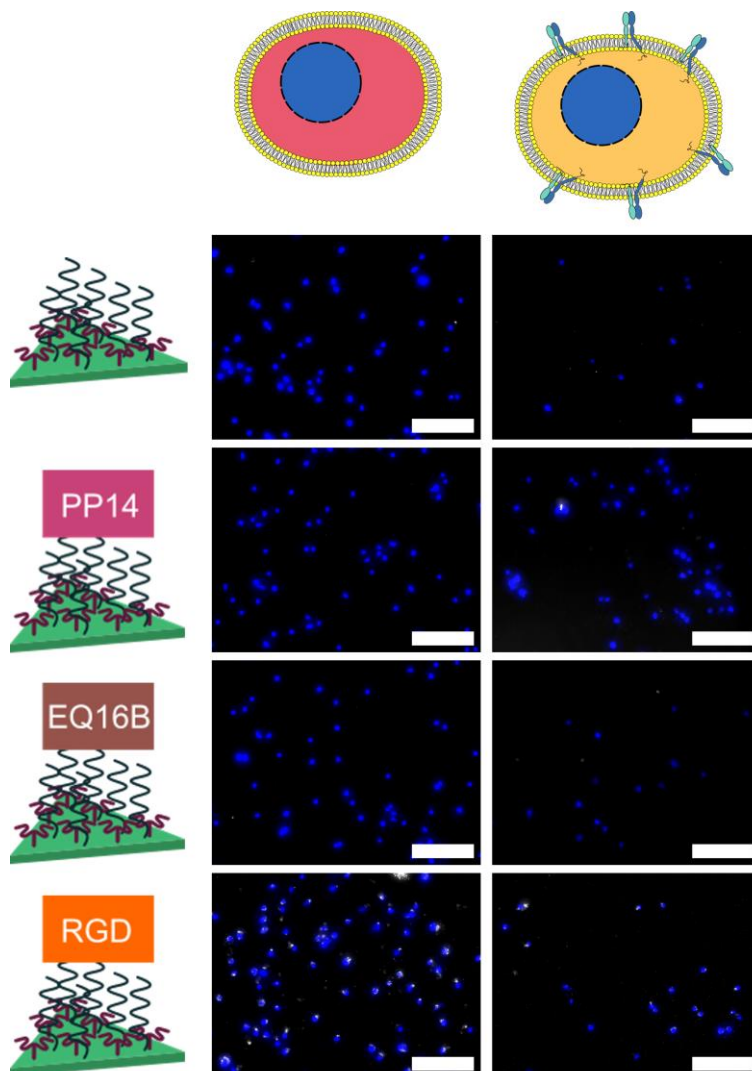


Figura 13. Imágenes de microscopía de campo oscuro de la internalización de M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en células EL4 (izquierda) y Jurkat (derecha) tras 24h de incubación. Los núcleos celulares se tiñeron con diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las barras de escala corresponden a  $50 \mu\text{m}$ .

### 2.3.2. Estudios de hipertermia óptica con nanoprismas en linfocitos T

Para los ensayos *in vitro* de terapia fototérmica, se elige el ensayo colorimétrico de LIVE/DEAD que se ha usado en el Capítulo 4. Antes de

## Capítulo 5

iniciar los estudios de terapia fototérmica, se comprueba que el número de lavados es adecuado para retirar las nanopartículas que no están unidas a las células y probablemente se depositen durante las centrifugaciones. Dichas nanopartículas podrían interaccionar con el láser y en consecuencia no se conocería la efectividad de la terapia de manera adecuada. Puesto que las M-NPrs-GSH-PEG no se internalizan en ningún caso, se tomaron como control para determinar cuántos lavados son necesarios para retirar todos los NPrs que no se han internalizado. Asimismo, se estudió el posible efecto que tienen los M-NPrs-GSH-PEG-RGD en células Jurkat.

Para este experimento, se incuban los NPrs a una concentración de  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24 h. Tras la incubación, la suspensión de células se centrifuga entre 2 y 4 veces. Una vez retiradas las nanopartículas, las células en suspensión se irradian en las condiciones optimizadas en células Vero,  $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  con un tamaño de haz de 1 cm para irradiar todo el pocillo y 5 min de irradiación. Se confirma que dos lavados no son suficientes para retirar de la suspensión las nanopartículas unidas inespecíficamente (Figura 14). Al tercer lavado, no se produce muerte de la célula con los M-NPrs-GSH-PEG, pero se siguió viendo muerte en los NPrs-GSH-PEG-RGD, y fue necesario un cuarto lavado. Es un resultado inesperado puesto que se esperaba muerte con estas nanopartículas para cualquier número de lavados, ya que por microscopía de campo oscuro este material internalizaba.

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

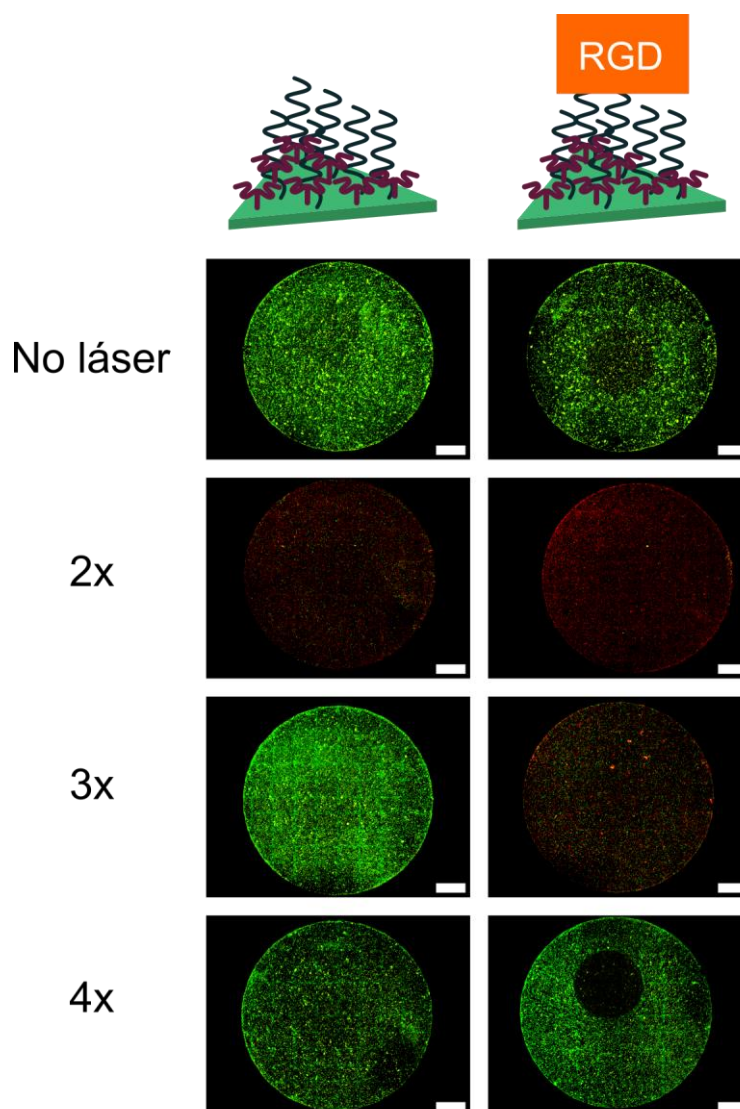


Figura 14. Estudio del número de lavados necesario para no producir interacción inespecífica de M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-RGD, a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en células Jurkat. Las fotos de microscopía corresponden a canales superpuestos de células Jurkat tratadas con calceína AM (verde), y homodímero de etidio (rojo). Se irradian las células con 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 18 h después de la irradiación. Escala 1000  $\mu\text{m}$ .

Para estudiar estos resultados, se cuantifica la cantidad de oro que ha internalizado en ambas líneas celulares por ICP-MS (Figura 15). En células Jurkat, se repite el mismo resultado que con las nanoesferas y la cantidad de NPrs por célula es mucho mayor que en células EL4, por lo que no se pueden valorar los resultados en células Jurkat. Con respecto a la otra línea, cuando se tratan las células con M-NPrs-GSH-RGD aumenta la internalización hasta

## Capítulo 5

4 veces si se compara con los M-NPrs-GSH-PEG. Mientras que el resto de los péptidos, M-NPrs-GSH-PP14 y M-NPrs-GSH-PEG-EQ16B, se obtienen cantidades similares, alrededor de  $2 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$ . Este resultado podría confirmar que los péptidos PP14 y EQ16B son selectivos para las integrinas que presenten la subunidad  $\alpha_4$ . Además, es probable que la integrina que interacciona con el tripéptido RGD esté en mayor proporción en las células EL4. Para confirmarlo, habría que hacer un ensayo de inmunofluorescencia como el realizado en la sección 2.2.1.

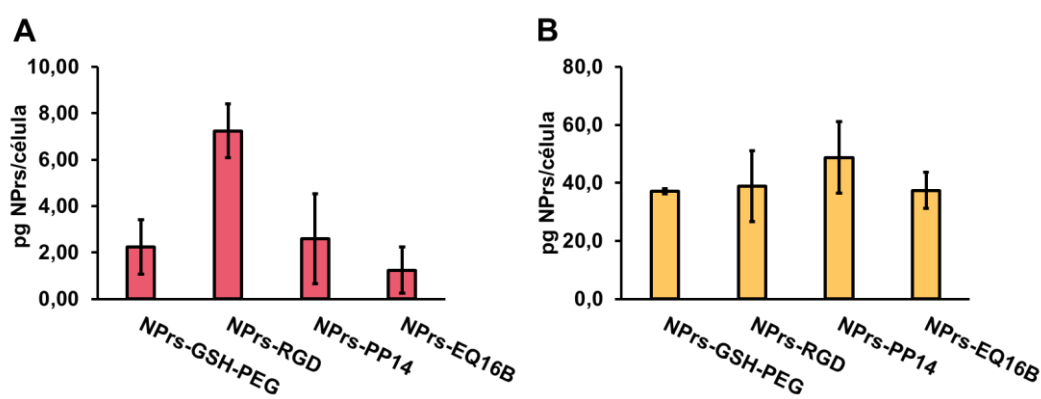


Figura 15. Cantidad de NPrs internalizados por las células EL4 (A) y Jurkat (B) después de 24 h de la incubación con M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . La cuantificación de oro se mide por ICP-MS.

Una vez estudiada la internalización por microscopía de campo oscuro e ICP, se pasó a realizar un ensayo de irradiación marcando las células con el kit de marcaje LIVE/DEAD. Los linfocitos T se tratan con los M-NPrs-GSH-PEG y M-NPrs-GSH-PEG-pep a una concentración de  $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  durante 24 h. Tras la incubación se lavan las células por centrifugación para retirar el exceso de nanopartículas. Posteriormente se irradia la disolución de células tratadas con un láser a 1064 nm tal como hemos descrito anteriormente. Los resultados de microscopía de fluorescencia para las células irradiadas se encuentran representados en la Figura 16 y Figura 18 para las células EL4 y Jurkat respectivamente. Cuando no se irradia con el láser, la viabilidad celular no se ve modificada por la presencia de los NPrs



## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

(Figura 17 y Figura 19). Tampoco se ven afectadas las células cuando se irradian con el láser en ausencia de nanopartículas. Con respecto al uso de los péptidos con la secuencia QIDS, no se ha observado una muerte celular destacable en EL4. En el caso de las Jurkat, sí que se observa una pequeña reducción de viabilidad celular cuando se utilizan los M-NPrs-GSH-PEG, M-NPrs-GSH-PEG-PP14 y M-NPrs-GSHPEG-EQ16B. Este resultado se puede explicar por la mayor agregación de las nanopartículas en el medio de cultivo celular de las células Jurkat.

Asimismo, cuando se tratan las células EL4 con nanoprismas funcionalizados con RGD se produce una reducción de la viabilidad de un 100%, y completamente opuesto a la alta viabilidad que presenta en células Jurkat. Los resultados confirman que los M-NPrs-GSH-PEG-RGD internalizan en alta cantidad en las células EL4. Sin embargo, el método actual de lavado no es adecuado para separar las nanopartículas de las células. El desarrollo de un método adecuado para los lavados de estas nanopartículas podría proporcionar una internalización más selectiva de los M-NPrs-GSH-PEG-PP14 en células Jurkat, pero no ha sido posible su optimización a lo largo de esta Tesis Doctoral. También, la cadena de PEG elegido para recubrir las nanopartículas podría ser muy grande, y evitar que los péptidos específicos de las integrinas interaccionen con los péptidos de las nanopartículas. Posibles soluciones para evitar este problema, implicarían el uso de moléculas espaciadoras que dispongan el péptido mejor en el espacio y mejoren su accesibilidad.

Los resultados aquí mostrados apuntan a que la integrina  $\alpha_v\beta_3$  está más expresada en las células EL4 y este hecho concuerda con los datos obtenidos por otras técnicas de biocaracterización como la microscopía de campo oscuro y el ICP-MS. Por lo que se puede concluir que nuestro material M-NPrs-GSH-PEG sigue siendo un material ideal para terapia que requieran un

## Capítulo 5

direccionamiento a un lugar específico. Aún falta un mayor estudio de la importancia de la disposición del péptido sobre la nanopartícula y encontrar sondas que sean más específicas para una determinada célula.

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

Con láser:

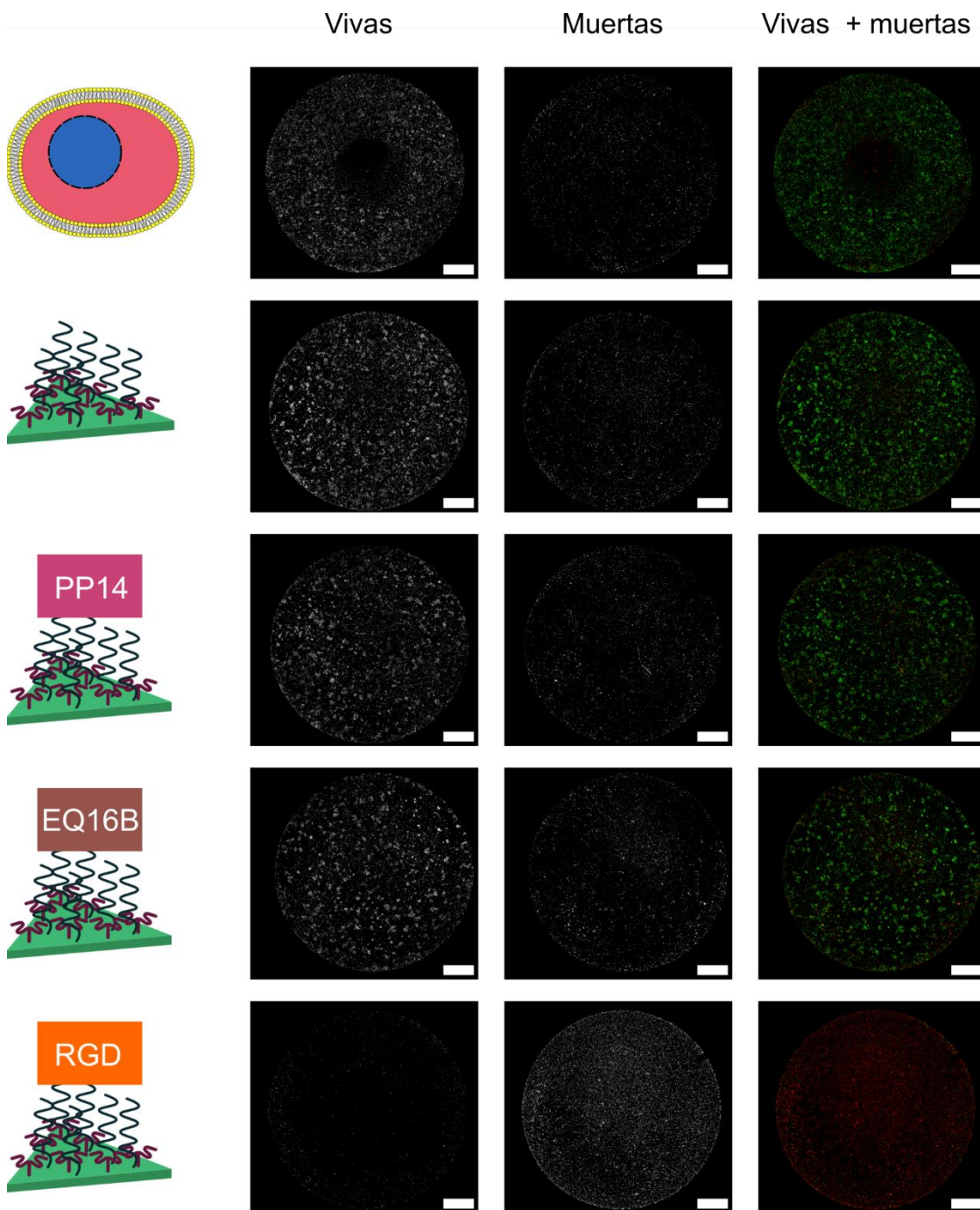


Figura 16. Estudio de irradiación con células EL4 incubadas con M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24h. Las fotos de microscopía corresponden a células tratadas con calceína AM (vivas, verde), y homodímero de etidio (muertas, rojo), y los canales superpuestos (vivas + muertas). Se irradian las células con 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 18 h después de la irradiación. Las barras de escala corresponden a 1000  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 5

Sin láser:

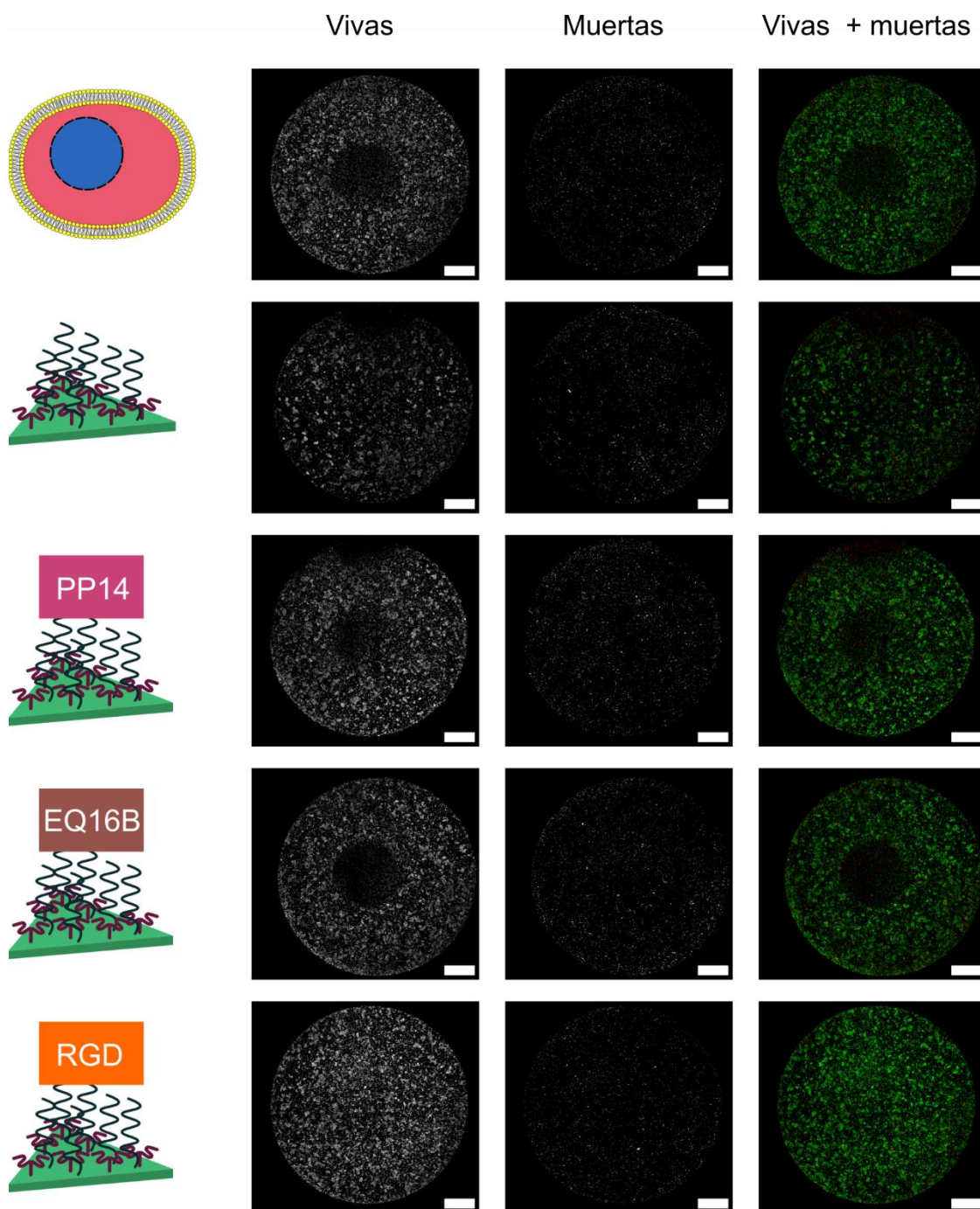


Figura 17. Estudio de viabilidad sin irradiación con células EL4 incubadas con M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las fotos de microscopia corresponden a células tratadas con calceína AM (vivas, verde), y homodímero de etidio (muertas, rojo), y los canales superpuestos (vivas + muertas). Se irradian las células con 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 18 h después de la irradiación. Las barras de escala corresponden a  $1000 \mu\text{m}$ .



## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

Con láser:

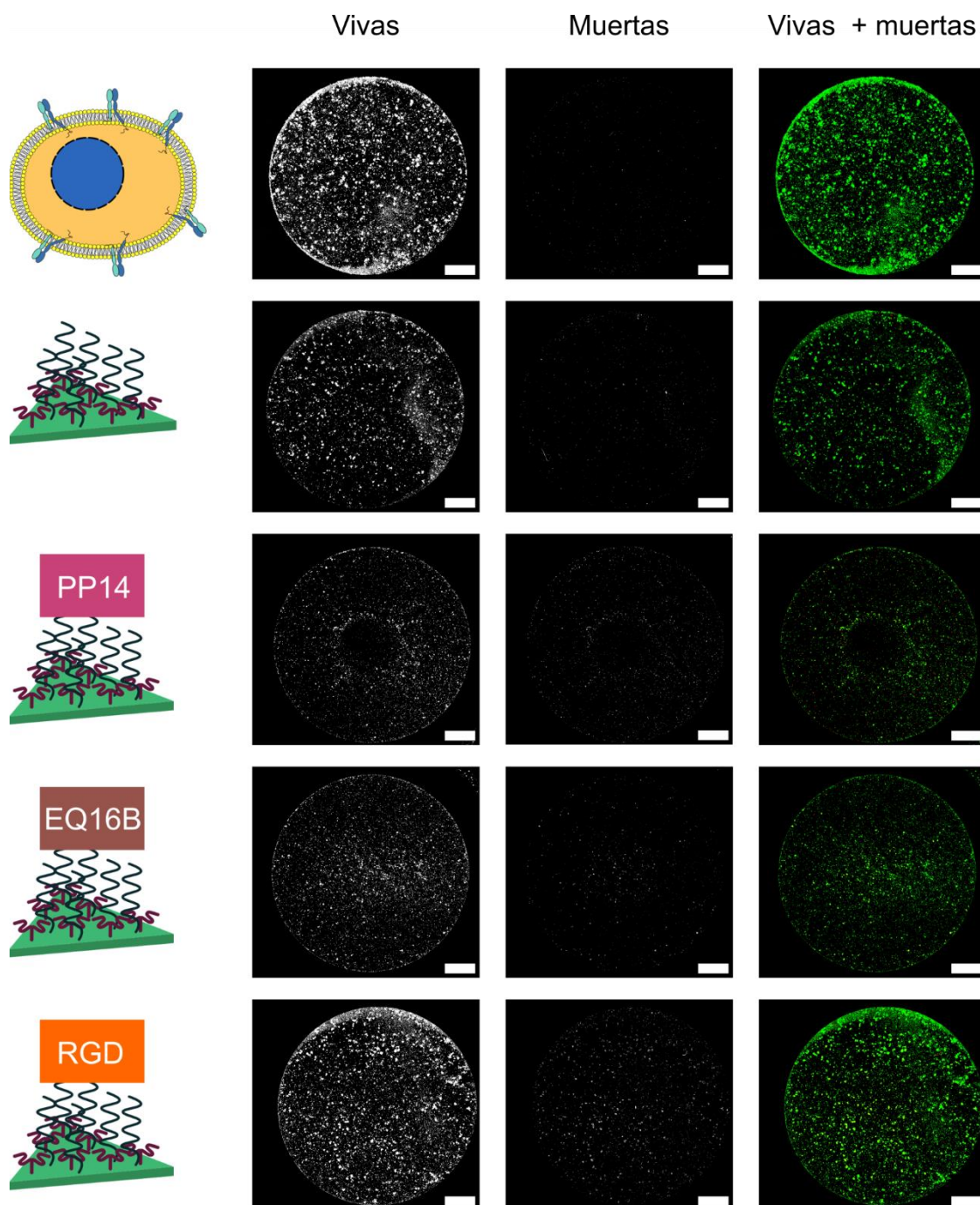


Figura 18. Estudio de irradiación con células Jurkat incubadas con M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24h. Las fotos de microscopía corresponden a células tratadas con calceína AM (vivas, verde), y homodímero de etidio (muertas, rojo), y los canales superpuestos (vivas + muertas). Se irradian las células con 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 18 h después de la irradiación. Las barras de escala corresponden a 1000  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 5

Sin láser

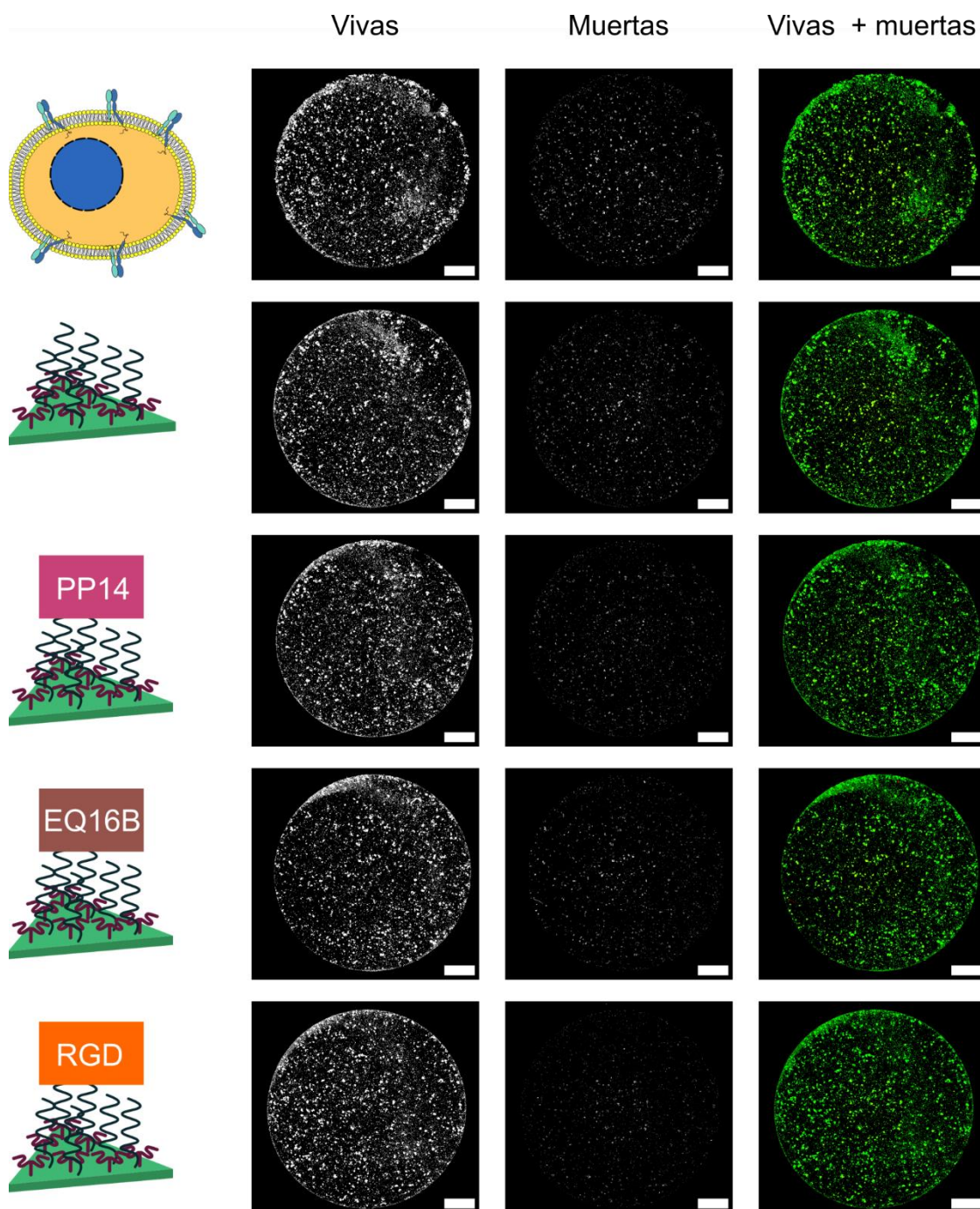


Figura 19. Estudio de viabilidad sin irradiación con células Jurkat incubadas con M-NPrs-GSH-PEG-pep a  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las fotos de microscopia corresponden a células tratadas con calceína AM (vivas, verde), y homodímero de etidio (muertas, rojo), y los canales superpuestos (vivas + muertas). Se irradian las células con 1600 mW durante 5 min. Las fotos se realizan 18 h después de la irradiación. Las barras de escala corresponden a 1000  $\mu\text{m}$ .

### **3. CONCLUSIONES**

Los péptidos unidos a las nanopartículas no producen una gran desestabilización de los nanomateriales si se compara con la doxorubicina debido a que los péptidos son menos hidrofóbicos. Se ha podido comprobar el éxito de la funcionalización mediante fluorescencia, DLS y potencial  $\zeta$ .

En los ensayos *in vitro* se han visto las dificultades de trabajar con células en suspensión, siendo necesario prestar mucha atención en los lavados por centrifugación. En este respecto se observa una mayor agregación de las nanopartículas en medio RPMI, si se compara con el DMEM.

Tras el estudio de cribado con las nanoesferas se comprueba que la secuencias QIDS y DWVI, que interaccionan con integrinas y cadherinas respectivamente, mostraron mejores resultados de internalización que los péptidos LDV y RGD cíclico. Aunque existen trabajos previos que confirman la interacción de ese motivo con la integrina  $\alpha 4$  de la secuencia LDV, no se obtiene una internalización apreciable por campo oscuro.

Con respecto a los ensayos de fototermia, se trabajó con tres secuencias funcionalizadas a las nanopartículas: PP14, EQ16B y RGD lineal. La derivatización de los M-NPrs-GSH-PEG no afecta a la estabilidad de las nanopartículas. Sin embargo, el modelo celular elegido dificulta la biocaracterización de estas nanopartículas, ya que son necesarios pasos de centrifugación para eliminar el exceso de nanopartículas. Este hecho limita la concentración de nanopartículas que se puede añadir en los ensayos *in vitro*. Únicamente las nanopartículas funcionalizadas con el péptido RGD producen mayor muerte cuando se incuban en presencia de las células EL4.

## Capítulo 5

Los resultados apuntan a una diferencia en la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en las células Jurkat y EL4, siendo esta última la que presenta una mayor concentración de la integrina que reconoce el motivo RGD.



### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1 Materiales y equipos

El ácido nítrico al 65%, el ácido clorhídrico al 37%, el ácido sulfúrico al 96%, el peróxido de hidrógeno al 33% y el tris(hidroximetil)aminometano se compraron de Panreac<sup>®</sup>. El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) se adquirió de Alpha Aesar. Hidróxido de sodio (NaOH), sal de sodio de *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (Ref: G4391-5MG) (RGD) y clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) fueron suministrados por Sigma-Aldrich y utilizados como se recibieron. El medio de cultivo DMEM<sup>™</sup> (Eagle completo modificado por Dulbecco), RPMI (Roswell Park Memorial Institute), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y PBS de Dulbecco (DPBS) suplementado con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se compraron de Lonza<sup>®</sup> (Basilea, Suiza). El DMEM y RPMI se complementan con un 10% de suero fetal bovino, un 5% de glutaMAX<sup>™</sup> y un 5% de penicilina/estreptomicina antes de su uso en cualquier cultivo celular.

Los péptidos MR7, EQ20A, EQ16B, BF14, BF17 y PP14 fueron sintetizados por síntesis en fase sólida grupo de Luca Gentiluci<sup>27</sup> y posteriormente purificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los péptidos llegaron al laboratorio en estado sólido en forma de polvo blanco, y eran insolubles en agua. Se resuspendieron usando dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la cuantificación del oro en los estudios de internalización, las muestras se analizaron por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) utilizando un instrumento Agilent 7700 (Agilent Technologies, EE. UU.) en el Servicio Central de Análisis de Bizkaia de la Universidad del País Vasco (EHU).

## Capítulo 5

Todas las imágenes de campo claro, campo oscuro y fluorescencia estándar de las células se obtuvieron con un Eclipse Ti con sistema de obturador de plano focal (FPS) de Nikon (Tokio, Japón) equipado con un sistema de contraste de fase, un sistema de visualización de campo oscuro y un bloque de filtros  $472 \pm 30/520 \pm 35$  nm (GFP),  $531 \pm 46/593 \pm 40$  nm (TRITC) cube y  $387 \pm 11/447 \pm 60$  nm (DAPI) conectado al software NIS-Elements Microscope Imaging.

### 4.2 Funcionalización de las nanopartículas con los péptidos

#### 4.2.1 Funcionalización de las nanoesferas con los péptidos

NS-PEG458 se derivatizaron con los péptidos que se presentan en la Figura 3 para promover la internalización celular. Brevemente, se incubaron 20 pmol de NS-PEG458 con 40  $\mu$ g de EDC y 61  $\mu$ g de sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. Los NS-PEG458 activados se incubaron luego durante 2 h a temperatura ambiente con 10 nmol de péptido. Finalmente, se añadieron 14  $\mu$ g de tris-(hidroximetil)aminometano (120 nmol) para derivatizar los grupos carboxílicos activados restantes durante 2 h a temperatura ambiente. Las NP funcionales se lavaron luego para retirar el exceso de ligando por centrifugación. Los NPs derivatizados se centrifugaron tres veces a 16000 g a 4 °C durante 30 min. Finalmente, las nanopartículas se resuspendieron en 500  $\mu$ L de volumen final.

#### 4.2.2 Funcionalización de los nanoprismas con los péptidos

Se derivatizaron M-NPr-GSH-PEG con Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (péptido RGD) y las secuencias Gly-Gln-Ile-Asp-Ser (PP14) y Ac-Gln-Ile-

## **Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores**

Asp-Ser diamino (EQ16B) para promover la internalización celular. Brevemente, se incubaron 0,5 mg de M-NPr-GSH-PEG con 40  $\mu$ g de EDC y 61  $\mu$ g de sulfo-NHS en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6 durante 30 minutos a 37 °C. Los M-NPr-GSH-PEG activados se incubaron luego durante 2 h a temperatura ambiente con 20 nmol de péptido. Finalmente, se añadieron 14  $\mu$ g de tris(hidroximetil)aminometano (120 nmol) para derivatizar los grupos carboxílicos activados restantes durante 2 h a temperatura ambiente. Las NP funcionalizadas se lavaron luego para retirar el exceso de péptido por centrifugación. Los NPrs funcionalizados se centrifugaron tres veces durante 10 minutos a 6000 rpm, y luego se resuspendieron en 500  $\mu$ L agua Milli-Q.

### **4.3 Caracterización de los materiales**

Los espectros UV-Vis-NIR se adquirieron usando un espectrofotómetro Cary 50 Probe® de Varian para las NS-PEG458 y Jasco V670 para los M-NPrs-GSH-PEG.

El potencial  $\zeta$  se midió en un equipo Brookhaven Zeta PALS. Se preparó una disolución 2 nM de NS-PEG458 en 1,6 mL de agua.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) se midió en un equipo Brookhaven Zeta PALS. Se preparó una disolución 2 nM de NS-PEG458 en 1,6 mL de KCl 1 mM. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando los índices de refracción del oro (parte real 2,64 e imaginaria 1,63) tomando como válidos los valores en porcentaje correspondientes a las medidas en número.

Para los geles de electroforesis, la dispersión de nanoesferas NS-PEG458 (10  $\mu$ L, 1 pmol de NSs en glicerol 10%) se cargó en un gel de agarosa (1% w/v) que estaba inmerso en una disolución Tris-borato-EDTA

## Capítulo 5

(TBE) 0,5% en una cubeta de electroforesis. La separación electroforética se realizó a 100 V durante 1h.

Para los geles de electroforesis de los nanoprismas: M-NPrs-PEG (10  $\mu$ L, 10  $\mu$ g de NPrs en glicerol 10%) se cargó en un gel de agarosa (0,7% w/v) que estaba inmerso en una disolución TBE 0,5% en una cubeta de electroforesis. La separación electroforética se realizó a 120 V durante 1h.

Las medidas de fluorescencia se hicieron con un espectrofotómetro de fluorescencia LS 55 (Perkin-Elmer, Reino Unido) equipado con una lámpara de xenón como fuente de excitación. Se seleccionó una apertura de la banda de absorción y de excitación de 8 nm, y una velocidad de barrido de 800 nm/min. La disolución del péptido MR7 se excitó a 280 nm, y se recogió la fluorescencia a 370 nm. Las muestras se colocaron en una cubeta Hellman 105.251-QS con un camino óptico de 3x3 mm, y se midieron 500  $\mu$ L de muestra.

### 4.4 Experimentos *in-vitro* de las nanopartículas con linfocitos T

Las células Jurkat (linfoblasto de células T de leucemia humana) y EL4 (linfoblasto de células T de linfoma de ratón) se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en RPMI (Jurkat) o DMEM (EL4) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutaMAX™ 2 mM y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina.

#### 4.4.1 Ensayo de citometría para determinar la presencia de la integrina $\alpha_4$

Se colocaron  $1 \cdot 10^6$  células en 500  $\mu$ L de PBS en un Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron dos concentraciones de anticuerpo 0,1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> y 0,5

## Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se usaron el conjugado de anti- $\alpha_4$  (Abcam ab24854) o del control de isotipo (Abcam ab136585). Se incubaron 30 min con el anticuerpo a 4 °C. Posteriormente, se lavaron las células mediante centrifugaciones de 400 g durante 5 min tres veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  PBS y se pasaron por el citómetro de flujo (Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter). Los datos se interpretaron con el *software* Kaluza 2.1 (Beckman Coulter).

### 4.4.2 Ensayo de viabilidad celular

Todas las suspensiones de NPRs se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (CHMLAB, Barcelona, España) antes de la adición a los cultivos celulares. Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. Después de 24 h, se añadió NS-PEG458-pep a 6 nM o M-NPRs-GSH-PEG-pep de oro  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y se incubó durante otras 24 h en las mismas condiciones. Para cuantificar la viabilidad de las células mediante el ensayo de azul de tripano, se colocaron las células en Eppendorf de 1,5 mL, y se centrifugaron 2400 rpm, 6 min hasta 4 veces resuspendiendo en 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. De la disolución final se cogieron 20  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con células, y se mezclaron con 20  $\mu\text{L}$  de disolución de azul de tripano. La mezcla final se añadió a una cámara de Neubauer para contar las células vivas, que no se marcaron, y las células muertas, que se marcaron en azul, contando un mínimo de 80 células por pocillo.

## Capítulo 5

### 4.4.3 Estudios internalización de nanopartículas por microscopía de campo oscuro

Para la preparación de las muestras de células fijadas para la visualización de microscopía de campo oscuro, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células Jurkat o EL4 por pocillo en una placa de 24 pocillos en un volumen total de 360  $\mu\text{L}$  y se cultivaron durante la noche en condiciones estándar de cultivo celular ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Al día siguiente, se añadieron las nanopartículas ( $V_f \text{ H}_2\text{O} < 10\%$ ) para tener la concentración final deseada de 6 nM para las NSs y  $75 \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para los NPrs. Tras 24 h de incubación, las células se colocaron en Eppendorf de 1,5·mL y se centrifugaron a 2400 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  DPBS. Se repitió este procedimiento 4 veces. Tras el cuarto lavado, las células se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (DMEM o RPMI). Se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de la disolución de células en un cubreobjetos de vidrio previamente tratado con poli-lisina (PLL) colocado en una placa de 24 pocillos.

El cubreobjetos había sido tratado el día anterior con una disolución de PLL 0,01% en 0,1 M de borato de sodio pH 8 durante 2 h. A continuación, se lavó con agua cuatro veces, y se dejó secar durante 2 h en condiciones de cultivo, y posteriormente en campana de cultivo durante 1 h.

Las células se dejaron incubando con los cubreobjetos cubiertos de PLL durante 1 h. Se observó que las células estuvieran bien adheridas y se centrifugó la placa a 1500 rpm durante 10 min. Se retiró el medio, y se lavó dos veces con 400  $\mu\text{L}$  de DPBS. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, y se lavaron dos veces con DPBS. Luego, se incubaron durante 10 minutos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (3  $\mu\text{M}$ ) para el marcaje de los núcleos. Los cubreobjetos se montaron en

## **Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores**

portaobjetos de microscopio de vidrio utilizando 6  $\mu\text{L}$  de Prolong® Diamond Antifade Mountant de Life Technologies® (Carlsbad, CA, EE. UU.).

### **4.4.4 Estudios internalización de nanopartículas funcionalizadas con péptidos por Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)**

El experimento se realizó por triplicado para cada material. Para estos ensayos, se cultivaron  $2,5 \times 10^5$  células en suspensión (400  $\mu\text{L}$ ) por pocillo durante la noche en condiciones de cultivo (37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$ ) en placas de 24 pocillos. Después de 24 h, se añadieron las NPs ( $V_f \text{ H}_2\text{O} < 10\%$ ) para tener la concentración final deseada 6 nM para las NSs y  $75 \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para los NPRs. Tras 24 h de incubación, las células se colocaron en Eppendorf de 2 mL y se centrifugaron a 2400 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Se repitió este procedimiento 4 veces. Tras el cuarto lavado, las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (DMEM o RPMI). Se cogieron 200  $\mu\text{L}$  por muestra y se contó el número de células en cada muestra utilizando una cámara Neubauer mediante una mezcla 1:1 con azul de tripano. A la disolución de células se añadió una solución de piraña (100  $\mu\text{L}$ ) para la digestión durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 300  $\mu\text{L}$  de agua regia y 2 horas de digestión a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron a 60 °C durante 15 minutos y se diluyeron con agua Milli-Q hasta un volumen total de 20 mL. La cantidad de oro se midió por ICP-MS. La cantidad total de oro (NPRs) en 20 mL correspondió a la cantidad total en un pocillo y se dividió por el número de células contadas en el pocillo.

## Capítulo 5

$$\frac{pg\ Au}{célula} = \frac{[Au] \left(\frac{mg}{mL}\right)}{número\ total\ de\ células} \cdot 20\ mL \cdot 1000$$

### 4.4.5 Ensayo de irradiación de nanoprismas con células en suspensión

Las células Jurkat o EL4 se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos con un volumen de 360  $\mu$ L y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular. Después de 24 h, se añadieron los NPRs ( $V_f\ H_2O < 10\%$ ) para tener la concentración final de 75  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> en 400  $\mu$ L de volumen total. Tras 24 h de incubación, las células se colocaron en Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a 2400 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 400  $\mu$ L DPBS. Se repitió este procedimiento 4 veces. Tras el cuarto lavado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio de cultivo (DMEM o RPMI). Se colocaron 200  $\mu$ L de la disolución de células en una placa de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos se colocó en una cámara de control de temperatura para mantener a las células entre 37-42 °C. Los pocillos se irradiaron con el láser Quatum Ventus 3 W (1064 nm) durante 5 min. Todos los ensayos de irradiación se realizaron de la misma manera. Posteriormente, las células se dejaron incubando 24 h a 37 °C y se realizó un ensayo de viabilidad por reactivo de LIVE/DEAD®.

### 4.4.6 Ensayo de viabilidad por reactivo de LIVE/DEAD®

Para cuantificar la viabilidad de las células se utilizó microscopía de fluorescencia. Para ello, se seleccionaron muestras de células sin NPRs, tratadas con NPRs, irradiadas por láser o no irradiadas. El reactivo de citotoxicidad de LIVE/DEAD® se usó en las muestras seleccionadas. Este kit presenta fluoróforos de dos colores para distinguir las células vivas de las



## **Funcionalización de nanopartículas de oro con péptidos vectores**

muertas. Se usaron dos fluoróforos: calceína AM (Acetoximetil) y etidio homodímero-1 (EthD-1), que reconocen respectivamente la actividad de la esterasa intracelular y la integridad de la membrana, ambos parámetros de viabilidad celular. Tras 18 h después del experimento de irradiación, se retiró el medio de cultivo, y se añadieron 100  $\mu$ L de DPBS que contenía 2  $\mu$ M calceína AM y 4  $\mu$ M EthD-1. Las células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente tapadas de la luz y mediante el software del microscopio invertido de fluorescencia se programó para realizar varias fotos de fluorescencia con objetivo de 10X para tener una foto completa del pocillo.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a Erica Quagliarini y Francesca Bussolari por su trabajo en la síntesis de los péptidos y su trabajo en los experimentos con nanoesferas.

## **6. REFERENCIAS**

- (1) Jeong, W. jin; Bu, J.; Kubiawicz, L. J.; Chen, S. S.; Kim, Y. S.; Hong, S. Peptide–Nanoparticle Conjugates: A next Generation of Diagnostic and Therapeutic Platforms? *Nano Conver.* **2018**, 5 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40580-018-0170-1>.
- (2) Farhadi, T.; Hashemian, S. M. R. Computer-Aided Design of Amino Acid-Based Therapeutics: A Review. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, 12, 1239–1254. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S159767>.
- (3) Rai, A.; Ferreira, L. Biomedical Applications of the Peptide Decorated Gold Nanoparticles. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2021**, 41 (2), 186–215. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1853031>.
- (4) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, 26 (10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.
- (5) Xiao, Y.; Reis, L. A.; Feric, N.; Knee, E. J.; Gu, J.; Cao, S.; Laschinger, C.; Londono, C.; Antolovich, J.; McGuigan, A. P.; Radisic, M. Diabetic Wound Regeneration Using Peptide-Modified Hydrogels to Target Re-Epithelialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113 (40), E5792–E5801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612277113>.
- (6) Shu, J. Y.; Panganiban, B.; Xu, T. Peptide-Polymer Conjugates: From Fundamental Science to Application. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, 64 (1), 631–657. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040412-110108>.
- (7) Parween, S.; Ali, A.; Chauhan, V. S. Non-Natural Amino Acids Containing Peptide-Capped Gold Nanoparticles for Drug Delivery Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (14), 6484–6493. <https://doi.org/10.1021/am4017973>.
- (8) Goddard, Z. R.; Marín, M. J.; Russell, D. A.; Searcey, M. Active

- Targeting of Gold Nanoparticles as Cancer Therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49 (23), 8774–8789. <https://doi.org/10.1039/d0cs01121e>.
- (9) Jahangirian, H.; Kalantari, K.; Izadiyan, Z.; Rafiee-Moghaddam, R.; Shameli, K.; Webster, T. J. A Review of Small Molecules and Drug Delivery Applications Using Gold and Iron Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, 14, 1633–1657. <https://doi.org/10.2147/IJN.S184723>.
- (10) Amina, S. J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- (11) Nativo, P.; Prior, I. A.; Brust, M. Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2008**, 2 (8), 1639–1644. <https://doi.org/10.1021/nn800330a>.
- (12) Danhier, F.; Le Breton, A.; Préat, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharm.* **2012**, 9 (11), 2961–2973. <https://doi.org/10.1021/mp3002733>.
- (13) Arosio, D.; Casagrande, C.; Manzoni, L. Integrin-Mediated Drug Delivery in Cancer and Cardiovascular Diseases with Peptide-Functionalized Nanoparticles. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19 (19), 3128–3151. <https://doi.org/10.2174/092986712800784748>.
- (14) Takagi, J. Structural Basis for Ligand Recognition by Integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, 19 (5), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.002>.
- (15) Huo, Y.; Hafezi-Moghadam, A.; Ley, K. Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. *Circ. Res.* **2000**, 87 (2), 153–159. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.2.153>.
- (16) Shimaoka, M.; Springer, T. A. Therapeutic Antagonists and Conformational Regulation of Integrin Function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2 (9), 703–716. <https://doi.org/10.1038/nrd1174>.
- (17) Kinashi, T. Intracellular Signalling Controlling Integrin Activation in Lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5 (7), 546–559. <https://doi.org/10.1038/nri1646>.
- (18) Takada, Y.; Ye, X.; Simon, S. The Integrins. *Genome Biol.* **2007**, 8 (5), 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- (19) Takada, Y.; Strominger, J. L.; Hemler, M. E. The Very Late Antigen

- Family of Heterodimers Is Part of a Superfamily of Molecules Involved in Adhesion and Embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84 (10), 3239–3243. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3239>.
- (20) Millard, M.; Odde, S.; Neamati, N. Integrin Targeted Therapeutics. *Theranostics* **2011**, 1, 154–188. <https://doi.org/10.7150/thno/v01p0154>.
- (21) Herter, J.; Zarbock, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J. Immunol.* **2013**, 190 (9), 4451–4457. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203179>.
- (22) Yu, Y.; Zhu, J.; Mi, L.-Z. Z.; Walz, T.; Sun, H.; Chen, J. F.; Springer, T. A. Structural Specializations of  $\alpha 4\beta 7$ , an Integrin That Mediates Rolling Adhesion. *J. Cell Biol.* **2012**, 196 (1), 131–146. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110023>.
- (23) Taneja, P.; Sharma, S.; Sinha, V. B.; Yadav, A. K. Advancement of Nanoscience in Development of Conjugated Drugs for Enhanced Disease Prevention. *Life Sci.* **2021**, 268 (December 2020), 118859. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118859>.
- (24) De Marco, R.; Greco, A.; Calonghi, N.; Dattoli, S. D.; Baiula, M.; Spampinato, S.; Picchetti, P.; De Cola, L.; Anselmi, M.; Cipriani, F.; Gentilucci, L. Selective Detection of A4 $\beta$ 1 Integrin (VLA-4)-expressing Cells Using Peptide-functionalized Nanostructured Materials Mimicking Endothelial Surfaces Adjacent to Inflammatory Sites. *Pept. Sci.* **2018**, 110 (5), e23081. <https://doi.org/10.1002/bip.23081>.
- (25) De Marco, R.; Tolomelli, A.; Juaristi, E.; Gentilucci, L. Integrin Ligands with  $\alpha/\beta$ -Hybrid Peptide Structure: Design, Bioactivity, and Conformational Aspects. *Med. Res. Rev.* **2016**, 36 (3), 389–424. <https://doi.org/10.1002/med.21383>.
- (26) Wang, N.; Zhao, Z.; Lv, Y.; Fan, H.; Bai, H.; Meng, H.; Long, Y.; Fu, T.; Zhang, X.; Tan, W. Gold Nanorod-Photosensitizer Conjugate with Extracellular PH-Driven Tumor Targeting Ability for Photothermal/Photodynamic Therapy. *Nano Res.* **2014**, 7 (9), 1291–1301. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0493-0>.
- (27) Gentilucci, L.; Gallo, F.; Meloni, F.; Mastandrea, M.; Del Secco, B.; de Marco, R. Controlling Cyclopeptide Backbone Conformation with  $\beta/\alpha$ -Hybrid Peptide–Heterocycle Scaffolds. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (19), 3243–3251. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201600448>.
- (28) Zhao, J.; Santino, F.; Giacomini, D.; Gentilucci, L. Integrin-Targeting Peptides for the Design of Functional Cell-Responsive Biomaterials.

*Biomedicines* **2020**, *1* (8), 307.

- (29) Vilchis-Juárez, A.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Morales-Avila, E.; Ocampo-García, B.; Díaz-Nieto, L.; Luna-Gutiérrez, M.; Jiménez-Mancilla, N.; Pedraza-López, M.; Gómez-Oliván, L. Molecular Targeting Radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to <sup>177</sup>Lu-Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10* (3), 393–404. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1721>.
- (30) Doro, F.; Colombo, C.; Alberti, C.; Arosio, D.; Belvisi, L.; Casagrande, C.; Fanelli, R.; Manzoni, L.; Parisini, E.; Piarulli, U.; Luisson, E.; Figini, M.; Tomassetti, A.; Civera, M. Computational Design of Novel Peptidomimetic Inhibitors of Cadherin Homophilic Interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (9), 2570–2573. <https://doi.org/10.1039/c4ob02538e>.
- (31) Vashist, S. K.; Zhang, B.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F.-S. Sulfo-N-Hydroxysuccinimide Interferes with Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Anal. Biochem.* **2011**, *417* (1), 156–158. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.045>.
- (32) Soni, G.; Yadav, K. S. Applications of Nanoparticles in Treatment and Diagnosis of Leukemia. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.043>.
- (33) Coughlin, B. P.; Lawrence, P. T.; Lui, I.; Luby, C. J.; Spencer, D. J.; Sykes, E. C. H.; Mace, C. R. Evidence for Biological Effects in the Radiosensitization of Leukemia Cell Lines by PEGylated Gold Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2020**, *22* (2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-4765-1>.
- (34) Lundberg, B. B. Preparation and Characterization of Polymeric PH-Sensitive STEALTH® Nanoparticles for Tumor Delivery of a Lipophilic Prodrug of Paclitaxel. *Int. J. Pharm.* **2011**, *408* (1–2), 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.061>.
- (35) Singh, V.; Erb, U.; Zöller, M. Cooperativity of CD44 and CD49d in Leukemia Cell Homing, Migration, and Survival Offers a Means for Therapeutic Attack. *J. Immunol.* **2013**, *191* (10), 5304–5316. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301543>.
- (36) Stefanick, J. F.; Omstead, D. T.; Kiziltepe, T.; Bilgicer, B. Dual-Receptor Targeted Strategy in Nanoparticle Design Achieves Tumor Cell Selectivity through Cooperativity. *Nanoscale* **2019**, *11* (10), 4414–4427. <https://doi.org/10.1039/c8nr09431d>.
- (37) Depince-Berger, A.-E.; Aanei, C.; Iobagiu, C.; Jeraiby, M.; Lambert,

## Capítulo 5

- C. New Tools in Cytometry. *Morphologie* **2016**, *100* (331), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.05.001>.
- (38) Chen, C.; Chen, T.; Li, Y.; Xu, Y. MiR-19a/19b Improves the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Gene Ther.* **2021**, *28* (1–2), 29–37. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0122-3>.
- (39) Haycock, C. P.; Balsamo, J. A.; Glass, E. B.; Williams, C. H.; Hong, C. C.; Major, A. S.; Giorgio, T. D. PEGylated PLGA Nanoparticle Delivery of Eggmanone for T Cell Modulation: Applications in Rheumatic Autoimmunity. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *Volume 15*, 1215–1228. <https://doi.org/10.2147/IJN.S234850>.
- (40) Kamiloglu, S.; Sari, G.; Ozdal, T.; Capanoglu, E. Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Front.* **2020**, *1* (3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.
- (41) Saed, B.; Munaweera, R.; Anderson, J.; O'Neill, W. D.; Hu, Y. S. Rapid Statistical Discrimination of Fluorescence Images of T Cell Receptors on Immobilizing Surfaces with Different Coating Conditions. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94730-3>.
- (42) Cepek, K. L.; Rimm, D. L.; Brenner, M. B. Expression of a Candidate Cadherin in T Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (13), 6567–6571. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6567>.

# **Capítulo 6**

## **Conclusiones**





## CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio de las propiedades coloidales de nanopartículas de oro (AuNPs). Nos hemos centrado en la síntesis, funcionalización y aplicaciones de dos formas de AuNPs: nanoesferas y nanoprismas. Entre las aplicaciones se han utilizado como amplificadores de la señal de SPR, nanotransportadores de fármacos y nanocalentadores para terapia fototérmica. Los resultados obtenidos con el trabajo realizado durante el desarrollo de la tesis han dado lugar a una serie de conclusiones expuesta en cada uno de los capítulos. A continuación, se presentan a modo de resumen las siguientes conclusiones:

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro en fase acuosa. Se prepararon nanoesferas con dos diámetros diferentes, 3 y 14 nm siguiendo los protocolos publicados en bibliografía mediante la reducción del ácido tetracloroáurico con borohidruro y citrato. Posteriormente, la nanoesferas sintetizadas con citrato (NS-Cit) fueron sustituidas por diversos polietilenglicol (PEG) para aumentar la estabilidad mediante el uso de polímeros de PEG que presentarán un grupo tiol en uno de los extremos para producir un enlace fuerte Au-S. En el caso de los nanoprismas, se realizó una optimización del método para obtener diferentes tamaños de nanopartícula que no requieran el uso de ningún surfactante. Por esta metodología se obtuvieron tres tamaños de nanoprismas.

En segundo lugar, se optimizó la funcionalización de AuNPs con un intercalante de ADN mediante el acoplamiento con carbodiimida. En el caso de las nanoesferas estabilizadas con PEG, se comprobó que la presencia de la parte alifática cercana al grupo tiol es crucial para mejorar la estabilidad

## Capítulo 6

del material y aumentar la cantidad de doxorubicina unida a cada nanopartícula. Asimismo, los NPRs presentaban un poco de agregación tras las funcionalizaciones con doxorubicina.

En tercer lugar, la estrategia de amplificación de la señal de SPR mediante la funcionalización de nanopartículas con doxorubicina no presentó buenos resultados, produciéndose amplificación de la señal únicamente cuando se utilizaban los nanoclústers funcionalizados con doxorubicina. Además, se producía una baja especificidad en la aplicación, ya que interaccionan con la sonda ADN aunque no se haya formado el complejo de doble hebra. Este resultado puso de manifiesto la importancia de la presentación espacial de la molécula unida a la nanopartícula y que en este caso hizo difícil la interacción de la DOX con el híbrido ADN:ARN.

En el Capítulo 3, se utilizaron las nanopartículas funcionalizadas con doxorubicina como transportadores de fármaco. El sistema elegido presenta unas buenas propiedades coloidales y una interacción débil con las proteínas, que produce la modificación de la estructura secundaria de la BSA. Tampoco se produce una concentración alta de especies reactivas de oxígeno, que podría desfavorecer el uso de estas nanopartículas.

De este estudio, se concluye que la nanopartículas con doxorubicina presentaban una mejor respuesta que el fármaco libre en modelos de cáncer de mama, debido a su mayor sensibilidad a elementos tóxicos. No obstante, no se produce una respuesta suficiente de muerte celular y se requiere una mejora del modelo utilizado. La carga de doxorubicina que se puede unir a la nanopartícula es muy baja, impidiendo hacer comparaciones con cantidades de doxorubicina más tóxica puesto que estamos limitados por la concentración de nanopartículas.

En el Capítulo 4, se presentó una nueva metodología de purificación basada en el empleo de glutatión para obtener NPRs triangulares de oro sin la

necesidad de procedimientos de purificación que requieran mucho tiempo ni materiales específicos. Además, de evitar el uso de materiales tóxicos como el CTAB, que dificultarían su uso en aplicaciones *in vitro* o *in vivo*. Se obtuvo nanoprismas triangulares con un alto rendimiento (42%), sin nanopartículas de oro esféricas en una única síntesis. El rendimiento de NPrs obtenido fue comparable al rendimiento total (NPrs + NSs) informado para otros métodos sintéticos y al menos en una escala de cantidad de siete veces.

El protocolo de síntesis permite el ajuste de la banda LSPR de los NPrs de oro en la ventana biológica de NIR, al menos de 900 a 1200 nm, lo que lo hace relevante para una variedad de aplicaciones biotecnológicas. Comparamos nuestro método directamente con la separación por electroforesis en gel desarrollada anteriormente y mostramos cómo la purificación con GSH era más fácil de escalar y proporcionaba un mejor rendimiento y una mayor estabilidad.

Además, los nanoprismas separados con GSH muestran menos interacciones no específicas con células que pueden cambiarse con ligandos vectorizantes que allanan el camino para una mayor selectividad en aplicaciones terapéuticas. Asimismo, demostramos su uso en aplicaciones de hipertermia óptica en dos líneas celulares. Los nanoprismas purificados por esta metodología solo producen la muerte de la célula cuando están funcionalizados con péptidos específicos.

En el Capítulo 5, se estudió la selectividad *in vitro* de nanopartículas funcionalizadas con péptidos que tiene como diana las integrinas  $\alpha_4$ . Los péptidos unidos a las nanopartículas no producen una gran desestabilización de los nanomateriales si se compara con la doxorubicina debido a que los péptidos son menos hidrofóbicos. Se ha podido comprobar el éxito de la funcionalización mediante fluorescencia, DLS y potencial  $\zeta$ .

## Capítulo 6

En los ensayos *in vitro* se han visto las dificultades de trabajar con células en suspensión, siendo necesario prestar mucha atención en los lavados por centrifugación. En este respecto se observa una mayor agregación de las nanopartículas en medio RPMI, si se compara con el DMEM.

Tras el estudio de cribado con las nanoesferas se comprueba que la secuencias QIDS y DWVI, que interaccionan con integrinas y cadherinas respectivamente, mostraron mejores resultados de internalización que los péptidos LDV y RGD cíclico. Aunque existen trabajos previos que confirman la interacción de ese motivo con la integrina  $\alpha 4$  de la secuencia LDV, no se obtiene una internalización apreciable por campo oscuro.

Con respecto a los ensayos de fototerapia, se trabajó con tres secuencias funcionalizadas a las nanopartículas: PP14, EQ16B y RGD lineal. La derivatización de los M-NPrs-GSH-PEG no afectan a la estabilidad de las nanopartículas. Sin embargo, el modelo celular elegido dificulta la biocaracterización de estas nanopartículas, ya que son necesarios pasos de centrifugación para eliminar el exceso de nanopartículas. Este hecho limita la concentración de nanopartículas que se puede añadir en los ensayos *in vitro*. Únicamente las nanopartículas funcionalizadas con el péptido RGD producen mayor muerte cuando se incuban en presencia de las células EL4.

Los resultados apuntan a una diferencia en la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en las células Jurkat y EL4, siendo esta última la que presenta una mayor concentración de la integrina que reconoce el motivo RGD.

