



**Universidad**  
Zaragoza

## **Trabajo Fin de Grado**

### **Nanopartículas magnéticas para reacciones bioortogonales *in vitro***

*Magnetic nanoparticles for in vitro bioorthogonal reactions*

Autor

**Eduardo Moreno Antolín**

Directora

**Raluca Maria Fratila**

**Grado en Biotecnología**

**Facultad de Ciencias**

**2017**



## ANEXO IV

### AUTORIZACIÓN DEL DEPÓSITO DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA (VISTO BUENO DIRECTORES/PONENTES)

#### ESTUDIANTE

Apellidos: Moreno Antolín

Nombre: Eduardo

TITULACIÓN: Grado en Biotecnología

#### TÍTULO DEL TRABAJO: (en castellano y en inglés)

Nanopartículas magnéticas para reacciones bioortogonales in vitro.

Magnetic nanoparticles for in vitro bioorthogonal reactions.

Dpto. Responsable de la propuesta: Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA)

- Los abajo firmantes, dan su visto bueno y autorizan el depósito de la memoria correspondiente al Trabajo Fin de Grado arriba indicado, realizado bajo nuestra tutela y que se ajusta a los criterios que marcan la normativa y la Guía Docente correspondiente.

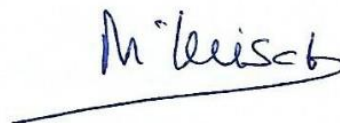
- Y autorizan su publicación en el repositorio institucional de la UZ. SI  NO

Zaragoza, 15 de ..... Junio ..... de 20 17



Fdo.: Dra. Raluca M. Fratila  
Director

Fdo.:  
Director



Fdo.: Dra. Maria Luisa Peleato  
Ponente

(Esta autorización deberá ser firmada por el director o directores del Trabajo Fin de Grado, así como el ponente si lo hubiere)



*A aquello que me ha permitido finalizar la carrera.*

*A la constancia de mis padres.*

*A la fuerza de mi hermana.*

*Al apoyo de Víctor.*



## ABREVIATURAS

**Ac<sub>4</sub>ManNAz:** N-azidoacetil-D-manosamina tetraacetilada

**Alq.:** alquino o ciclooctino, 2-(2-(2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanamina

**CHCl<sub>3</sub>:** cloroformo

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DBCO:** dibencilciclooctino-PEG<sub>4-5/6</sub>-Sulforodamina B

**DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle's medium*

**DPBS:** *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

**EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**EPR:** retención y permeabilidad aumentada

**MNPs:** nanopartículas magnéticas

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**PM:** peso molecular

**NPs:** nanopartículas.

**PBS:** *Phosphate-Buffered Saline*

**PEG:** polietilenglicol (NH<sub>2</sub>-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>16</sub>-OCH<sub>3</sub>)

**PMAO:** poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)

**SSB:** tetraborato de sodio.

**TAMRA:** tetrametilrodamina-cadaverina

**TBE:** tris, borato, EDTA

**TEM:** microscopio electrónico de transmisión

**UV:** ultravioleta

@: indica "funcionalizado con"





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1. Nanotecnología y biomedicina .....	2
1.2. Nanopartículas magnéticas e hipertermia .....	3
1.3. Química <i>click</i> bioortogonal y glicoingeniería metabólica .....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
3.1. Transferencia a agua de las MNPs hidrófobas .....	5
3.2. Funcionalización con polietilenglicol (PEG) .....	6
3.3. Funcionalización con ciclooctino .....	7
3.4. Caracterización de MNPs .....	7
3.4.1. Determinación de la concentración de hierro .....	7
3.4.2. Electroforesis en gel de agarosa .....	8
3.4.3. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	8
3.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	8
3.4.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	8
3.4.6. Potencial Z .....	9
3.5. Cultivos celulares .....	9
3.5.1. Ensayo de viabilidad con MTT .....	9
3.5.2. Ensayo de marcaje de membrana .....	10
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>10</b>
4.1. Caracterización de MNPs .....	10
4.1.1. Transferencia a agua .....	10
4.1.2. Funcionalización con PEG y ciclooctino .....	13
4.2. Marcaje de membrana .....	16
4.2.1. Marcaje con DBCO .....	16
4.2.2. Unión de nanopartículas magnéticas .....	17
4.3. Viabilidad celular .....	19
4.3.1. Citotoxicidad de Ac <sub>4</sub> ManNAz y DBCO .....	19
4.3.2. Citotoxicidad de NPs .....	20
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>21</b>



## RESUMEN

Las nanopartículas tienen una gran versatilidad, y son útiles en una amplia variedad de campos, incluida la biomedicina. Encontramos entre ellas el grupo de las nanopartículas magnéticas, que son capaces de generar calor ante la acción de un campo magnético alterno. Esto ha propiciado un gran interés por las mismas en su aplicabilidad para el tratamiento del cáncer de forma más eficaz y menos tóxica que los tratamientos actuales.

Uno de los retos actuales es conseguir guiar las nanopartículas al tejido tumoral de manera específica y selectiva *in vivo*, de forma que puedan inyectarse por vía intravascular y llegar a tumores no accesibles. La química *click* bioortogonal es una de las estrategias propuestas para lograrlo, utilizando una cicloadición azida–alquino promovida por tensión de anillo combinado con glicoingeniería metabólica.

En este trabajo se utilizan nanopartículas magnéticas funcionalizadas con polietilenglicol, y se estudia la influencia de la funcionalización con distintas cantidades de ciclooctino, molécula que intervendrá en la reacción *click*. También se hace una primera valoración de la citotoxicidad de las nanopartículas no concluyente. La optimización de este proceso permitirá continuar con pruebas de hipertermia en cultivos *in vitro* con las nanopartículas unidas covalentemente a la membrana plasmática de las células.

## ABSTRACT

Nanoparticles have a great versatility, and can be useful in a broad range of fields, including biomedicine. Among them, magnetic nanoparticles are particularly interesting due to their ability to generate heat when exposed to an alternate magnetic field. This capacity has awakened great interest for their use in cancer therapy in a more effective and less toxic way than current treatments.

An important current challenge is to guide nanoparticles to the tumoral tissue *in vivo* in a specific and selective manner, so that they could be injected systemically and reach non-accessible tumors. To achieve that, bioorthogonal click chemistry is one of the strategies chosen, using strain promoted azide-alkyne cycloaddition and metabolic glycoengineering.

In this project, polyethyleneglycol functionalized magnetic nanoparticles are used, and the influence of functionalization with different quantities of cyclooctyne –molecule that will participate in the click reaction– is studied. Cytotoxicity assays were carried out as well, but they resulted inconclusive. The optimization of this process will allow future hyperthermia studies, carried out on *in vitro* cell cultures with nanoparticles covalently attached to the plasma membrane.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Nanotecnología y biomedicina

La nanotecnología es percibida como una de las grandes revoluciones de este siglo con un enorme potencial y futuro prometedor, como ya predijo el premio Nobel Richard Feynman en su famoso discurso de 1959 (*There's plenty of room at the bottom*) donde, sin bautizarla, hablaba de esta nueva disciplina. Actualmente se pueden encontrar variedad de definiciones de la nanotecnología en la literatura, coincidiendo la gran mayoría en que es la ciencia y tecnología de las cosas pequeñas, en particular de aquellas con tamaño inferior a 100 nm en al menos una de sus dimensiones. En estas condiciones, los materiales tienen propiedades significativamente distintas a las que poseen a escala macroscópica.<sup>1,2</sup>

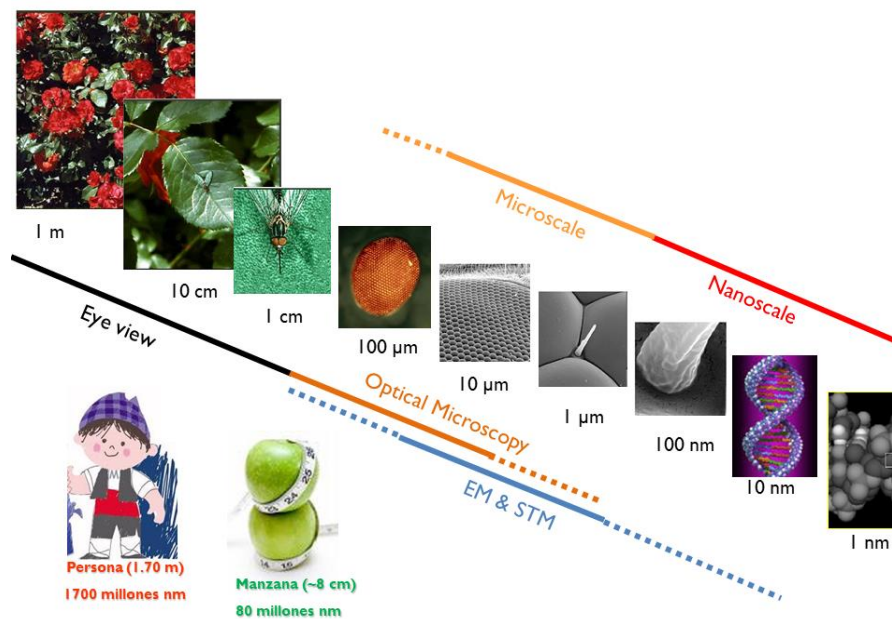


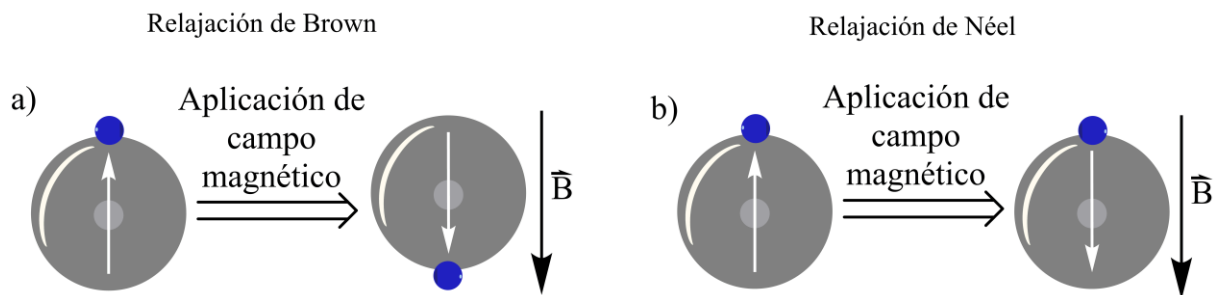
Figura 1. Escala nanométrica. Adaptado de M. Luna.

Existen principalmente dos tipos de efectos dependientes del tamaño: la relación superficie/volumen, y los efectos cuánticos. El primer efecto puede comprenderse mejor en el caso de una nanopartícula esférica, donde su superficie es proporcional al cuadrado de su radio,  $r$ , y su volumen es proporcional a  $r^3$ . En este rango nanométrico de radios, el ratio aumenta enormemente. Así, cada átomo en la superficie tiene menos vecinos que los átomos en el material macroscópico, derivando en menos coordinación y enlaces no satisfechos.<sup>3</sup>

A pesar de considerarse recientes, los nanomateriales se han incorporado en gran variedad de productos, desde tejidos anti-manchas hasta fármacos, pasando por cremas solares y biosensores<sup>1</sup>. Debido a que el tamaño de las nanopartículas es similar al de las macromoléculas biológicas (DNA, proteínas, etc.) (Figura 1), han propiciado la aparición de dos nuevos campos: la Nanomedicina y la Bionanotecnología. La primera consiste en la aplicación de los conceptos de la nanotecnología para aplicaciones médicas, mientras que la última engloba toda la investigación biológica a nivel nanoscópico. Se puede por tanto encontrar nanotecnología en investigación, diagnóstico y tratamiento.<sup>2</sup>

## 1.2. Nanopartículas magnéticas e hipertermia

Las nanopartículas magnéticas (MNPs), y especialmente las de óxido de hierro, tienen un creciente número de aplicaciones biomédicas gracias a su biocompatibilidad, estabilidad, no toxicidad, y la posibilidad de ser superparamagnéticas. El superparamagnetismo ocurre en aquellas nanopartículas ferromagnéticas y ferrimagnéticas que forman un monodominio magnético. Estas propiedades permiten que, gracias a mecanismos de relajación, las MNPs aumenten su temperatura en presencia de un campo magnético alterno. La relajación magnética es el proceso por el cual una nanopartícula vuelve a su estado termodinámicamente favorable al ser expuestas a un campo magnético. Tras una variación en dicho campo, una nanopartícula puede rotar para orientar su momento magnético en la dirección del campo magnético externo. Este proceso se conoce como la *relajación de Brown* (Figura 2a). Cuando es el momento magnético de la MNPs el que oscila para alinearse con el campo magnético, se denomina *relajación de Néel* (Figura 2b). De normal, ambos procesos pueden suceder simultáneamente; en MNPs fijadas a un soporte sólido, sólo es posible que se dé la relajación de Néel, ya que éstas no podrán rotar.



**Figura 2.** Mecanismo de relajación de Brown (a) y Néel (b) tras la aplicación de un campo magnético sobre una nanopartícula magnética. Flecha blanca: momento magnético; flecha negra: campo magnético; punto azul: referencia de la nanopartícula.

La capacidad de producción de calor localizado ha despertado el interés de científicos y médicos en estas nanopartículas para su utilización en el tratamiento del cáncer mediante hipertermia. La hipertermia es un fenómeno de aumento de temperatura local o general de un organismo. Las células tumorales son más susceptibles al calor que las no tumorales. Un aumento de temperatura puede producir su muerte directa por métodos físicos, o la inducción de una muerte celular más tardía, al desencadenar procesos indirectos que la produzcan.<sup>8</sup> Se sabe que las células tumorales y las normales no tienen una sensibilidad al calor distinta de manera intrínseca. La mayor citotoxicidad que produce en tumores se debe al transporte de oxígeno y flujo sanguíneo ineficiente a los mismos. Esto sitúa a las células tumorales en un ambiente acidótico y privado de nutrientes que les confiere su sensibilidad a la temperatura.<sup>9,10</sup> La hipertermia también puede combinarse con tratamientos actuales del cáncer, como la quimioterapia y radioterapia, lo que permitiría una reducción en las dosis de estos tratamientos nocivos para los tejidos sanos.

Para conseguir una hipertermia localizada, las MNPs deben llegar al tumor de manera específica y selectiva. Esto se consigue en gran medida de manera pasiva gracias al efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR, por sus siglas en inglés). Este fenómeno tiene lugar en los tumores sólidos, y consiste en que macromoléculas o nanopartículas quedan atrapadas o se acumulan en dichos tumores, y son retenidas a altas concentraciones durante un tiempo prolongado. El efecto es debido, entre otras causas, al aumento de permeabilidad que tiene lugar en la pared vascular en determinadas situaciones (como inflamación o hipoxia). Gracias a esto, partículas y macromoléculas de entre 10 y 500 nm pueden acceder al espacio intersticial.<sup>11,12</sup> Este efecto puede aprovecharse para dirigir moléculas específicas a

un tumor, y utilizar estrategias como la química *click* que aumenten la especificidad y selectividad de las nanopartículas por las células cancerosas.<sup>13</sup>

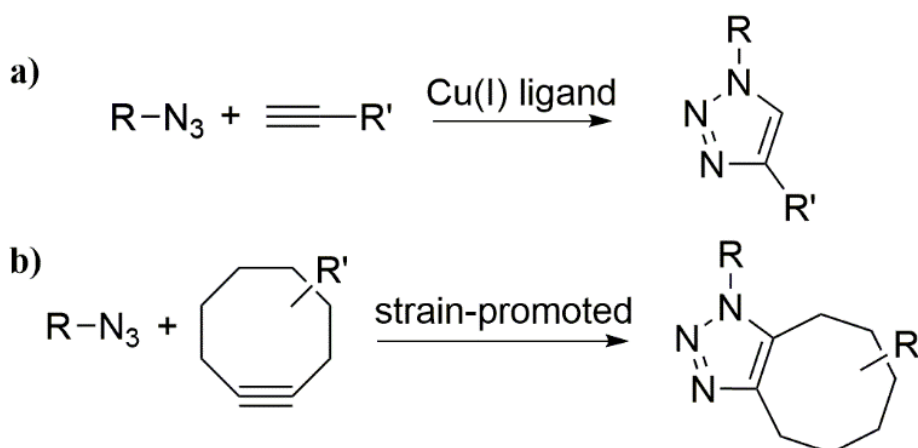
Actualmente, la hipertermia inducida por nanopartículas magnéticas sometidas a un campo magnético alterno externo, combinada con quimioterapia, ha resultado exitosa en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que augura un futuro prometedor en la nanotecnología para el tratamiento del cáncer.<sup>14</sup>

### 1.3. Química *click* bioortogonal y glicoingeniería metabólica

La “química *click*” se define como aquel conjunto de reacciones que cumplen los criterios de ser selectivas, con alto rendimiento, y buena cinética de reacción. Dentro de este grupo de reacciones, encontramos las denominadas bioortogonales, que además tienen que ser biocompatibles (tener lugar bajo condiciones suaves) y no deben interferir con otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas.<sup>15</sup>

Actualmente, es frecuente la utilización de conjugados con anticuerpos o proteínas fluorescentes (como GFP) para detectar o localizar células o biomoléculas. Sin embargo, la utilización de estas macromoléculas supone algunas limitaciones debido a su tamaño y sus propiedades físicas, como la imposibilidad de acceder a un antígeno que se encuentra dentro de la célula, o la alteración de la actividad de la proteína a la que están fusionados.<sup>16</sup>

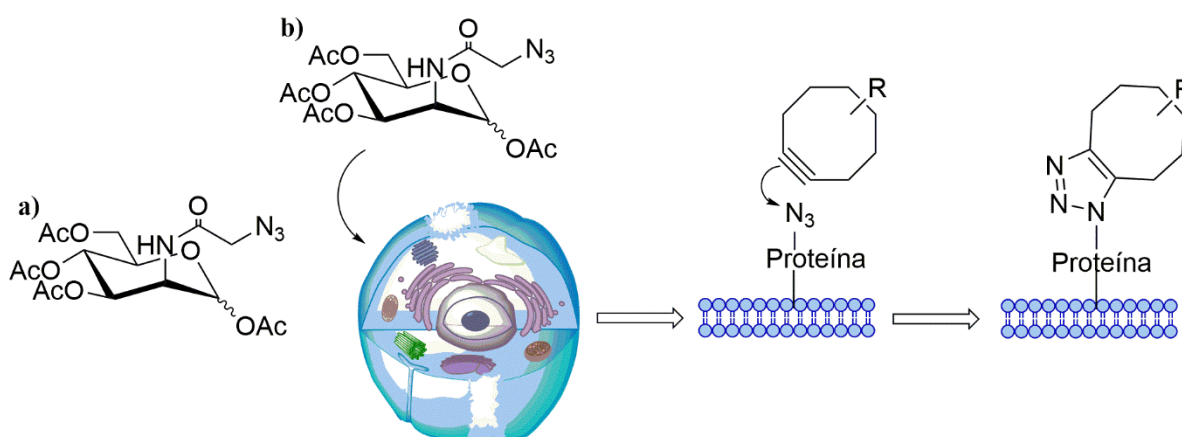
Una de las reacciones *click* más utilizadas es la cicloadición Huisgen azida-alquino catalizada por cobre (*Figura 3a*). En ella, un grupo azida reacciona con un alquino, formando un heterociclo cumpliendo las condiciones necesarias para ser considerada *click*, pero no es completamente bioortogonal: aunque ambos grupos son inertes en medio biológico, son poco frecuentes o inexistentes en las reacciones bioquímicas de los organismos y no se requieren altas temperaturas (superiores a 37 °C) para llevar a cabo la reacción, el catalizador puede tener efectos citotóxicos entre moderados y severos. Por ello, se utiliza una variante de esta reacción que no utiliza cobre, sino que la disminución de la energía de activación se consigue mediante un anillo tensionado: el ciclooctino (*Figura 3b*).<sup>15,17,18</sup>



**Figura 3.** (a) Cicloadición de Huisgen catalizada por cobre. (b) Cicloadición de azida y ciclooctino promovida por tensión de anillo. Figura adaptada de Agard et al., 2004.

La química bioortogonal es frecuentemente utilizada en asociación con la glicoingeniería metabólica para el marcaje y visionado molecular.<sup>19</sup> La glicoingeniería metabólica es una técnica que permite modificar la estructura de glicanos e introducir grupos funcionales utilizando la propia maquinaria metabólica de la célula. Para introducir grupos azida en los glicanos, en concreto ácido siálico con grupos azida, se administra un precursor sintético, la N-azidoacetil-D-manosamina tetraacetilada (Ac<sub>4</sub>ManNAz) como se representa en la *Figura 4*. Esto permitirá detectar las células mediante ciclooctinos aso-

ciados a fluoróforos, como es el caso del dibencilciclooctino unido a sulfurodamina B (DBCO). También permitirá la fijación a la membrana celular de nanopartículas y otras moléculas que presenten en su superficie algún grupo ciclooctinil. *In vivo*, una estrategia utilizada para la administración del Ac<sub>4</sub>ManNAz a los tumores es el aprovechamiento del efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR) explicado anteriormente. Utilizando otras nanopartículas, como liposomas, es posible introducir el precursor sintético en organismos vivos; éste se dirigirá a las células tumorales gracias al EPR. Posteriormente, las partículas terapéuticas (que poseerán un cicloalquino tensionado) se unirán específicamente al tumor por el efecto combinado del EPR y la química *click* bioortogonal.<sup>18</sup>



**Figura 4.** (a) Molécula de N-azidoacetil-D-manosamina tetraacetilada (b) Uso de la glicoingeniería metabólica para la utilización de química click y marcaje de membrana.

Además del tratamiento contra el cáncer, esta técnica permitirá llevar a cabo otro tipo de estudios como por ejemplo la influencia del calentamiento localizado en la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática, la creación de poros en la misma debido al calentamiento (lo que permitiría, por ejemplo, diseñar protocolos de transfección), o valorar si las nanopartículas se comportan igual dentro o fuera de la célula en lo relativo al calor generado cuando se someten a un campo magnético alterno.

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo se pretende funcionalizar y caracterizar nanopartículas magnéticas de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas. En concreto, dichas nanopartículas, todas ellas recubiertas de un polímero anfifílico, un fluoróforo y polietilenglicol, se funcionalizarán distintivamente con cantidades crecientes de un ciclooctino. Se valorará la influencia de las distintas cantidades de ciclooctino en la capacidad de unión de las nanopartículas a la membrana plasmática de células que presenten grupos azida en su glicocáliz. Asimismo, se evaluará la citotoxicidad de las nanopartículas y de los componentes utilizados en el marcaje de membrana.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de casas comerciales excepto el ciclooctino (ver más adelante), sintetizado por el laboratorio del profesor Jesús M. Aizpurua de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU), San Sebastián.

### 3.1. Transferencia a agua de las MNPs hidrófobas

Las MNPs de óxido de hierro (esféricas, diámetro de 12 nm) se sintetizaron previamente en el grupo por Vanessa Herrero, utilizando el método de descomposición térmica en medio orgánico (hexano + ácido oleico + oleilamina). Para obtener unas nanopartículas biocompatibles, el primer requerimiento es

que sean solubles en medio acuoso. Este objetivo se consiguió recubriéndolas con poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO), un polímero anfifílico con una cadena alifática y un grupo anhídrido.<sup>20,21</sup> Además, se añadió tetrametilrodamina-cadaverina (TAMRA), un fluoróforo que permitirá el seguimiento de las MNPs cuando sean utilizadas para posteriores experimentos.

#### *Protocolo de trabajo*

En un matraz de 500 mL, se preparó una disolución de 140 mg de PMAO (peso molecular 30-50 kDa) en 15 mL de CHCl<sub>3</sub>. Se añadieron posteriormente 2 mg de TAMRA disueltos en 2 mL de etanol y se dejaron reaccionar durante la noche, cubriendo el matraz con papel de aluminio para evitar la pérdida de intensidad de fluorescencia del fluoróforo.

El día siguiente se tomó el volumen equivalente a 10 mg de hierro de MNPs (previamente sintetizadas) que se encontraban en el medio orgánico descrito anteriormente, y se realizaron 3 lavados: en cada uno se añadió etanol, que desestabiliza las MNPs, y se usó un potente imán que las atrae y permite retirar el sobrenadante; cada lavado fue resuspendido en hexano excepto el último, que se hizo en 2 mL de CHCl<sub>3</sub>. A la disolución preparada de PMAO y TAMRA se añadieron 81 mL de CHCl<sub>3</sub> para obtener un volumen final de 100 mL, y se adicionó al matraz la suspensión de MNPs gota a gota en un baño de ultrasonidos en el que se dejó la mezcla durante 15 minutos. En este paso el polímero recubre las nanopartículas.

Para eliminar el disolvente orgánico se utilizó un rotavapor a 40 °C y entre 200 y 400 mbar. Se dejaron 5-10 mL de disolvente para evitar que la muestra se seque por completo. En este punto, se añadieron al matraz simultáneamente 15 mL de agua desionizada y 15 mL de NaOH (0,1 M), lo que supuso la hidrólisis de los grupos anhídrido del PMAO. Para eliminar el disolvente orgánico restante, se volvió a introducir la mezcla en el rotavapor a 70 °C y sin vacío, para evitar la entrada al sistema de la espuma que se forma en la reacción. Conforme se atenuaba la formación de burbujas, se disminuía la presión hasta llegar a un mínimo de 200 mbar.

A continuación, se filtró la mezcla resultante, aún caliente, utilizando filtros de 0,2 µm; así se eliminarían los posibles agregados de NPs y polímero. Por último, y para eliminar los restos de polímero no unido, se realizaron cuatro etapas de ultracentrifugación durante dos horas a 24000 rpm: las dos primeras a temperatura ambiente y las dos restantes a 14 °C.

### **3.2. Funcionalización con polietilenglicol (PEG)**

A partir de las MNPs que se transfirieron a agua, para continuar con el proceso de biocompatibilización y estabilización, se realizó una funcionalización con moléculas de PEG, que se unirían a los grupos carboxilo que aparecieron en el PMAO tras la hidrólisis.

#### *Protocolo de trabajo*

Cada reacción se realizó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL en el que se añadió el volumen equivalente a 1 mg de hierro de MNPs en medio acuoso. Para funcionalizar se necesitan 16,7 mg (22,26 µmol) de NH<sub>2</sub>-PEG-OCH<sub>3</sub> (PM: 750 Da) disueltos en 172 µL de tampón tetraborato de sodio 50 mM, pH=9 (SSB). Para la activación de los grupos carboxilo del PMAO y que se forme un enlace amida con el PEG, se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en dos adiciones de 6,25 mg de EDC disuelto en 20 µL de tampón SSB (50 mM, pH=9) cada una. Tras la primera adición, se dejó agitar la mezcla durante 30 minutos en oscuridad, y tras la segunda, se dejó agitar la mezcla durante 3 horas en oscuridad.

Finalmente, para eliminar el exceso de reactivos, se llevaron a cabo 8 lavados con agua milli-Q, usando dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, Millipore,



100 kDa), durante 15 minutos a 5000 rpm cada lavado. Tras el último paso de lavado, se resuspendieron las MNPs en un volumen final de 700  $\mu$ L de agua milli-Q.

### 3.3. Funcionalización con ciclooctino

Para realizar la reacción de química *click* en experimentos posteriores, las nanopartículas deben tener en su superficie un alquino cíclico con tensión en el anillo, por lo que se utilizó 2-(2-(2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanamina (desde ahora “ciclooctino”) (Figura 5). Este concepto de funcionalización es similar a los anteriores: formación de un enlace amida entre la amina del ciclooctino y los grupos carboxilo restantes del PMAO (se pretendía funcionalizar el 10%, 20% y 50% de los grupos carboxilo totales en distintos lotes de NPs).

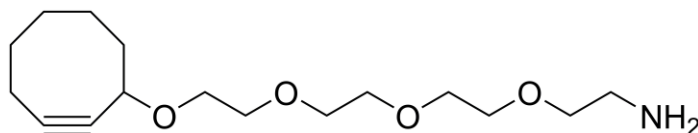


Figura 5. Estructura química del 2-(2-(2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanamina (ciclooctino).

#### *Protocolo de trabajo (para funcionalizar el 10% de carboxilos)*

En un Eppendorf de 1,5 mL se preparó la mezcla de reacción, con 91  $\mu$ L de ciclooctino (3 mM) y el volumen de MNPs funcionalizadas equivalente a 0,5 mg de Fe. Se realizaron dos adiciones de EDC, de 3,125 mg en 10  $\mu$ L de tampón SSB (50 mM, pH=9). Tras la primera adición se dejó agitar la mezcla durante 30 minutos en oscuridad, y tras la segunda se dejó agitar durante 3 horas en oscuridad. Antes de las adiciones se completó el volumen de la mezcla hasta 1,2 mL con tampón SSB (50 mM, pH=9).

Cuando terminó la reacción, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno a 5000 rpm. Se usaron dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, Millipore, 100 kDa). Tras el último paso de lavado, se resuspendieron las MNPs en un volumen final de 700  $\mu$ L.

### 3.4. Caracterización de MNPs

#### 3.4.1. Determinación de la concentración de hierro

Tras cada paso de síntesis o funcionalización de MNPs se necesita saber qué concentración de hierro tiene cada muestra para poder proceder al paso siguiente.

#### *Protocolo de trabajo*

Se determinó la concentración de hierro por métodos espectrofotométricos por la acción del Tiron (ácido 1,2-dihidroxibencen-3,5-disulfónico), una molécula que forma un complejo con el hierro adquiriendo un color entre amarillo y marrón dependiente de la concentración del metal. Para ello se necesita una recta de calibrado que se realizó con disoluciones de Fe(III) de 0, 100, 200, 400, 600 y 800  $\mu$ g/mL. Se trasvasaron 50  $\mu$ L de cada una a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. De cada muestra se tomaron 5  $\mu$ L y se llevaron a 50  $\mu$ L con agua milli-Q (o con hexano, si las MNPs están en medio orgánico). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

A cada tubo se añadieron 100  $\mu$ L de agua regia (HCl/HNO<sub>3</sub> en proporción 3:1) y se calentaron durante 15 minutos a 60 °C. Este paso disuelve el hierro de las MNPs y destruye la capa orgánica o recubrimientos, si los hay. Después se añadieron 350  $\mu$ L de agua milli-Q para detener la reacción y se pasaron 50  $\mu$ L de cada muestra a una placa de 96 pocillos.

A cada uno de los pocillos se adicionaron 100  $\mu$ L de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 M, pH=9,7) y 60  $\mu$ L de una disolución previamente preparada, formada por 50  $\mu$ L de KOH (4N) y 10  $\mu$ L de Tiron (0,25 M). Se dejó reposar de 15 a 20 minutos y se midió la absorbancia a 480 nm.

Con los datos de los estándares se hace una recta de calibrado de la que se interpola la concentración de hierro de las muestras.

### **3.4.2. Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis sirve para identificar los cambios de carga que sufren las MNPs en cada paso de funcionalización al tener cada vez menos grupos carboxilo libres. Como la muestra tiene un color marrón debido al hierro, se pueden apreciar las bandas con luz visible. Además, también es útil esta técnica para visualizar la cantidad de polímero (PMAO) que no se ha unido a las NPs, cargando los sobrenadantes de cada lavado y visualizando esta vez con luz UV.

#### *Protocolo de trabajo*

Se prepararon los geles de agarosa y tampón de tris, borato, EDTA (TBE) 0,5X al 1% (m/v) con 15 pocillos. Se mezclaron las muestras con tampón de carga, glicerol al 25% con TBE (0,5X). El volumen total cargado fueron 8  $\mu\text{L}$  (6  $\mu\text{L}$  de muestra + 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga). Las electroforesis se dejaron correr a 90 V durante 45 minutos.

### **3.4.3. Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico o TGA es una técnica que consiste en la medida del peso de una muestra frente al incremento de la temperatura bajo una atmósfera controlada. Permite detectar los cambios de peso que suelen producirse en reacciones como descomposiciones, sublimaciones, reducciones, desorciones, absorciones, etc. De este modo se puede cuantificar el recubrimiento orgánico de las NPs.

#### *Protocolo de trabajo*

Se utilizó un equipo *Universal V4.5A TA Instruments* para la medida del peso frente a la temperatura. Las medidas de pérdida de materia orgánica se realizaron por calentamiento de las muestras en atmósfera de aire, aumentando la temperatura a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta una temperatura final de 800  $^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron previamente liofilizadas para eliminar restos de agua.

### **3.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) emplea un haz de electrones para la visualización de una muestra, lo que permite aumentar la potencia amplificadora de un microscopio óptico convencional. Esta técnica es útil en la caracterización morfológica de las NPs, especialmente de los núcleos inorgánicos (los recubrimientos orgánicos no se aprecian con facilidad).

#### *Protocolo de trabajo*

Se utilizó un microscopio *Tecnai T20 (FEI)*, con un cañón termoiónico y voltaje acelerador de hasta 200 kV (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Universidad de Zaragoza).

Para la visualización es precisa la preparación de la muestra. Estando muy diluida (en hexano si las NPs son hidrófobas o en agua si son hidrófilas), se aplicaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono, y se dejaron secar al aire antes de ser introducidas al microscopio.

El protocolo de tratamiento de imágenes para la realización de histogramas del diámetro de las NPs se detalla en el anexo I.

### **3.4.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

La dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) es una técnica espectroscópica utilizada para medir el radio hidrodinámico de moléculas, partículas o coloides en disolución. Por ello,

es útil en la determinación de distribución de tamaños de NPs en suspensión. El analito en suspensión es irradiado con una luz láser monocromática, y se miden las fluctuaciones de la intensidad de la luz difractada en función del tiempo. Los valores recogidos de intensidad se transforman por el analizador de la señal para determinar la distribución de tamaños de las partículas de la muestra.

#### *Protocolo de trabajo*

Las muestras se prepararon diluyendo las NPs en agua, a una concentración final de 0,05 mg/mL, con un volumen final mínimo de 1 mL. La cubeta de medición acepta un volumen de unos 800  $\mu$ L, y en ella se realizaron 5 medidas de cada muestra a 25 °C con un equipo *Malvern Zetasizer*, irradiando las muestras con un láser de helio-neón de longitud de onda 633 nm. Se ajustó el pH de todas las muestras para que éste sea similar.

### **3.4.6. Potencial Z**

El potencial Z es una medida de la carga superficial de las NPs, estando su magnitud relacionada con la estabilidad del sistema coloidal. Con valores altos de potencial Z (ya sean positivos o negativos), las partículas tenderán a repelerse entre ellas. Sin embargo, con valores pequeños, podrían agregar si no existe otro tipo de repulsiones de tipo estérico. La medición se realiza con un láser incidente que atraviesa el centro de la muestra permitiendo detectar la luz dispersada a un ángulo de 13°. Al aplicar un campo eléctrico a la celda, equipada con electrodos, cualquier partícula en movimiento presente en la muestra provocará una fluctuación en la intensidad de la luz detectada, con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula. El posterior tratamiento de la señal mediante el software adecuado permite obtener diversos parámetros relacionados con el potencial Z y la movilidad electroforética de las partículas.

#### *Protocolo de trabajo*

Las muestras se prepararon en las mismas condiciones y se utilizó el mismo equipo de medida que para medir el DLS.

## **3.5. Cultivos celulares**

Para experimentos *in vitro* se utilizó la línea celular MCF-7, células de adenocarcinoma mamario humano. Se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) y glutamina (2 mM) (lo que se denominará medio de Eagle modificado por Dulbecco completo, cDMEM).

### **3.5.1. Ensayo de viabilidad con MTT**

El ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) permite valorar la salud metabólica de las células viables de un cultivo que ha sido tratado con distintas concentraciones de una sustancia cuya citotoxicidad se quiere evaluar. Si las células son capaces de reducir la sal a un producto insoluble de formazán, implica que todavía tiene actividad reductasa. Esta medida se compara con un cultivo control sin tratar que representa el 100% de la actividad metabólica.

#### *Protocolo de trabajo*

En una placa de 96 pocillos se sembraron 5000 células/pocillo en un volumen total de 200  $\mu$ L/pocillo y se dejaron crecer durante 24 horas. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se añadieron las sustancias potencialmente citotóxicas (disueltas en cDMEM) a las concentraciones que se pretenda valorar, y únicamente cDMEM en la columna control. Se incubó durante otras 24 horas. Se eliminó el

medio con las sustancias a testar, y se lavaron los pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de cDMEM dos veces. Tras el segundo lavado, se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de cDMEM y 20  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL). Cuando se observaron cristales azules en las células al microscopio (alrededor de una hora y media después), se centrifugó la placa a 2500 rcf durante 25 minutos. Finalmente, se eliminó por completo el líquido de cada pocillo y se disolvieron los cristales en dimetilsulfóxido (DMSO). Se agitó suavemente, y se midió la absorbancia a 550 nm.

Los ensayos con Ac<sub>4</sub>ManNAz y DBCO se realizaron por quintuplicado. El ensayo con NPs se realizó por triplicado.

### 3.5.2. Ensayo de marcaje de membrana

Las distintas nanopartículas funcionalizadas se sometieron a un ensayo en el cual se pretendía valorar su capacidad de unión a la membrana plasmática de las células. Para ello, se colocaron cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro en una placa de 24 pocillos y se sembraron 2000 células sobre éstos en un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  en cada pocillo. Se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después, se retiró el medio de cultivo y se añadió cDMEM a los pocillos que no contenían Ac<sub>4</sub>ManNAz (que se denominarán N<sub>3</sub><sup>-</sup>) y cDMEM con Ac<sub>4</sub>ManNAz (50  $\mu\text{M}$ ) a aquellos pocillos cuyas células incorporarían el azúcar (que se denominarán N<sub>3</sub><sup>+</sup>). Tras otras 24 horas incubando a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, se sustituyeron todos los medios de cultivo por DMEM (sin suero fetal bovino) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Esto se hizo para permitir a las células adaptarse a este medio, que fue en el que se añadieron las MNPs, pues con el suero podrían perder estabilidad y agregar. En este momento se realizó la reacción *click* reemplazando el medio sin suero por: medio sin suero (control); DBCO (20  $\mu\text{M}$ ); NPs con PEG; NPs con PEG y ciclooctino (10%); NPs con PEG y ciclooctino (20%); y NPs con PEG y ciclooctino (50%). Todas las NPs se añadieron a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  Fe/mL. Todas muestras se añadieron sobre células N<sub>3</sub><sup>-</sup> y N<sub>3</sub><sup>+</sup>. Se incubó a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 1 hora y se procedió a la fijación de las células. A partir de la adición de las muestras, la placa se protegió de la luz, para evitar la pérdida de intensidad de los fluoróforos.

Para la fijación se eliminaron los distintos medios de cultivo y se lavó 3 veces con PBS bajo en fosfato (DPBS) suplementado con Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> para posteriormente fijar cada muestra con 200  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído (4%) durante 20 minutos a 4 °C, protegido de la luz. Tras la fijación, se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS durante 5 minutos cada una.

Una vez fijada la muestra se tiñeron los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se dejaron actuar 200  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,6  $\mu\text{M}$  del colorante durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Después, se lavaron otras dos veces con PBS para eliminar el exceso de DAPI. Los cubreobjetos se montaron finalmente en portaobjetos utilizando 6  $\mu\text{L}$  de medio de montaje ProLong®, y una vez seco se selló alrededor con esmalte de uñas transparente.

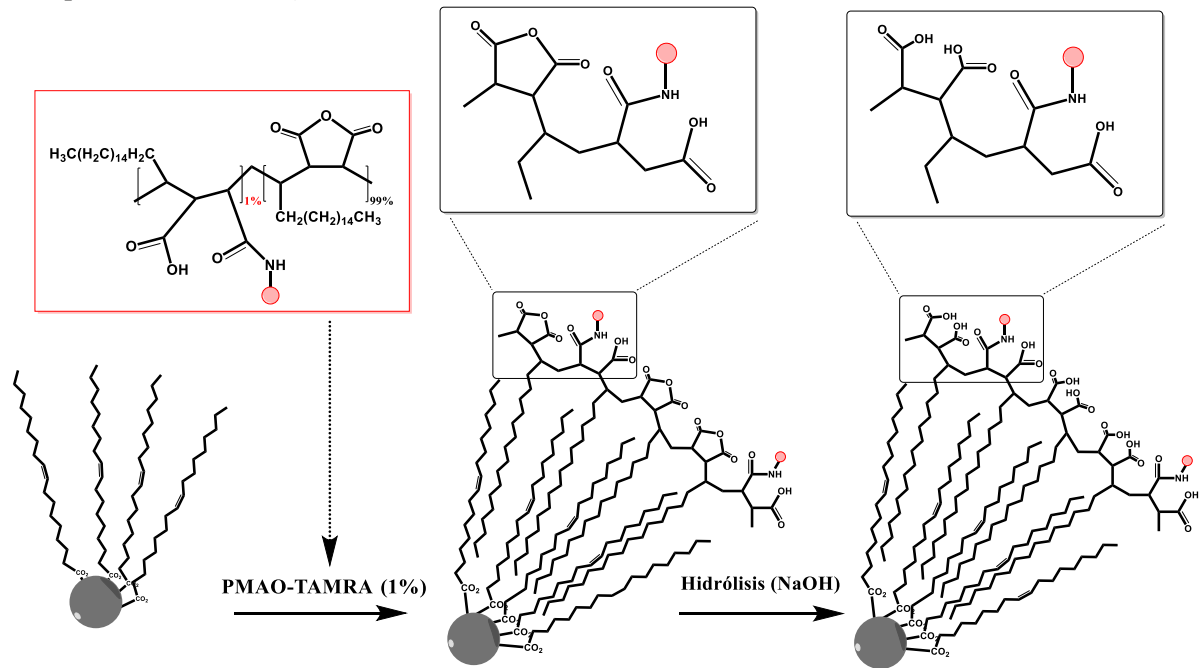
Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV10i con el objetivo de inmersión en aceite a 60X. Los fluoróforos TAMRA (o DBCO) y DAPI se excitan con láseres a 559 y 405 nm respectivamente. La sensibilidad e intensidad de los láseres fue optimizada y mantenida constante para la toma de todas las imágenes. Para el tratamiento de las mismas se utiliza el software ImageJ, siguiendo el mismo protocolo para todas las imágenes del mismo experimento.<sup>22</sup>

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

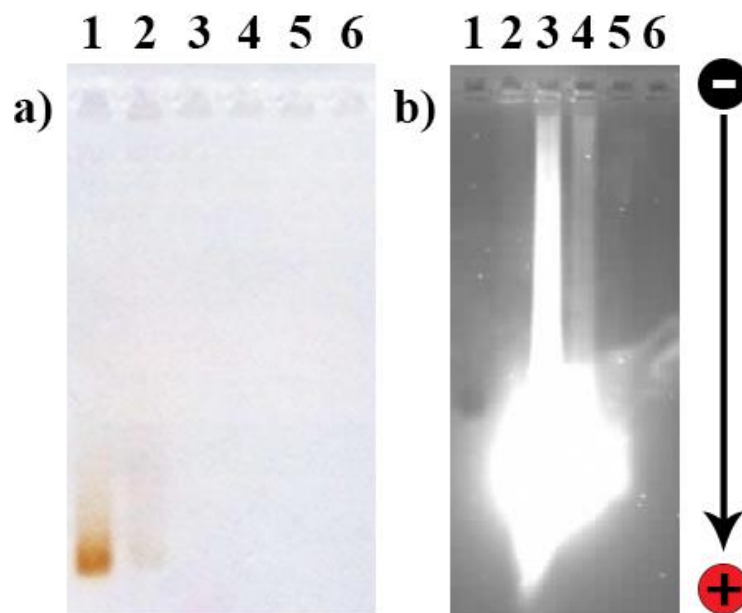
### 4.1. Caracterización de MNPs

#### 4.1.1. Transferencia a agua

Las nanopartículas magnéticas sintetizadas en el grupo se encontraban en medio orgánico. Para su uso en aplicaciones biológicas deben ser estables en medio acuoso, por lo que se recubren de PMAO, que se intercala con las cadenas de ácido oleico mediante sus propias cadenas alifáticas. Este polímero contiene grupos anhídrido que son hidrolizados con NaOH una vez el PMAO cubre la nanopartícula. Esto da lugar a grupos carboxilo que aportan a la superficie de las NPs la carga necesaria para ser estable en medio acuoso, y también permitirán posteriores funcionalizaciones. Los dos pasos de la transferencia se esquematizan en la *Figura 6*.



**Figura 6.** Esquema de la transferencia a agua mediante el recubrimiento con el polímero PMAO-TAMRA (1%). A la izquierda, las NPs en medio orgánico con recubrimiento de ácido oleico. En el centro, las NPs con el polímero unido mediante interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas. A la derecha, los grupos anhídrido del PMAO se han hidrolizado, pasando a ser las NPs estables en medio acuoso. Realizada con ChemDraw Profesional 16.0.



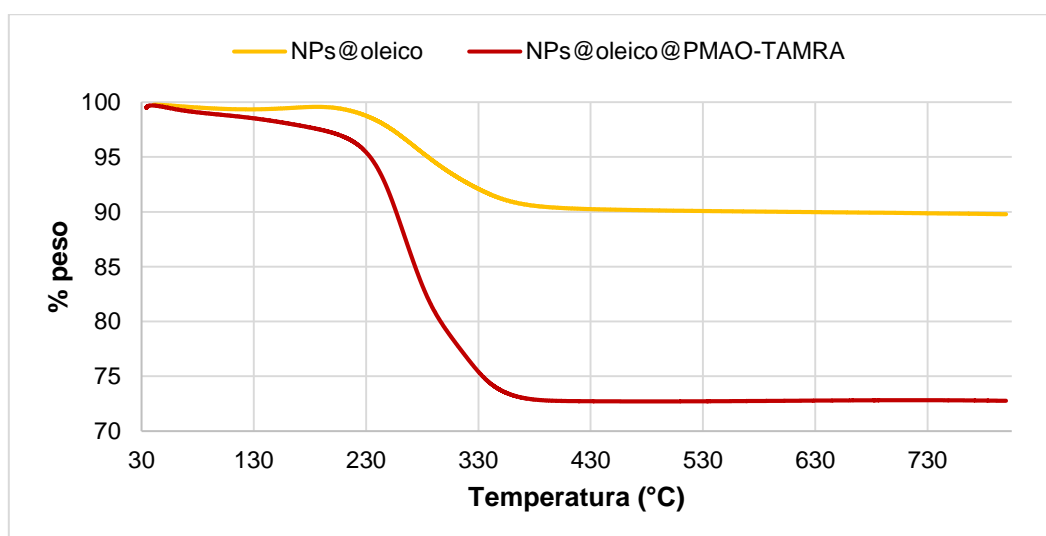
**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v). Transferencia a agua y lavados. (a) Fotografía con luz visible. (b) Fotografía con luz UV. (1) Referencia de una transferencia a agua anterior, del mismo lote de NPs en medio orgánico; (2) NPs transferidas a agua; (3, 4, 5 y 6) Sobrenadantes sucesivos de los cuatro pasos de lavado.

Cuando este proceso (denominado *transferencia a agua*) finaliza, se debe eliminar el exceso de polímero, para lo que se realizaron tres lavados. Éstos consistieron en cuatro periodos de ultracentrífuga, entre los cuales se retiró el sobrenadante y las MNPs se resuspendieron de nuevo en agua. Para comprobar la correcta eliminación del polímero, se analizaron los sobrenadantes mediante una electroforesis en gel de agarosa (*Figura 7b*). Irradiando el gel con luz ultravioleta se puede observar el polímero, ya que es fluorescente al excitarse en este rango de longitud de onda. Además, la misma técnica electroforética permite comparar de manera rápida la transferencia a agua con otras anteriores que actúen como control, como muestra la *Figura 7a*.

La transferencia a agua se produjo con éxito, y su movilidad electroforética fue similar a la de un lote de MNPs hidrofílicas anterior que partían del mismo lote en medio orgánico (*Figura 7a*). Las nuevas NPs eran también estables y no formaban agregados. El exceso de PMAO también se eliminó correctamente. En la *Figura 7b* la gran cantidad de polímero del primer lavado invade el resto de carriles; no obstante, el recorrido de cada muestra revela que con cada lavado se elimina polímero, y el último carril (número 6), con el sobrenadante del último lavado, no muestra nada de fluorescencia, lo que refleja que el todo el PMAO que no se había unido a las NPs se retiró por completo

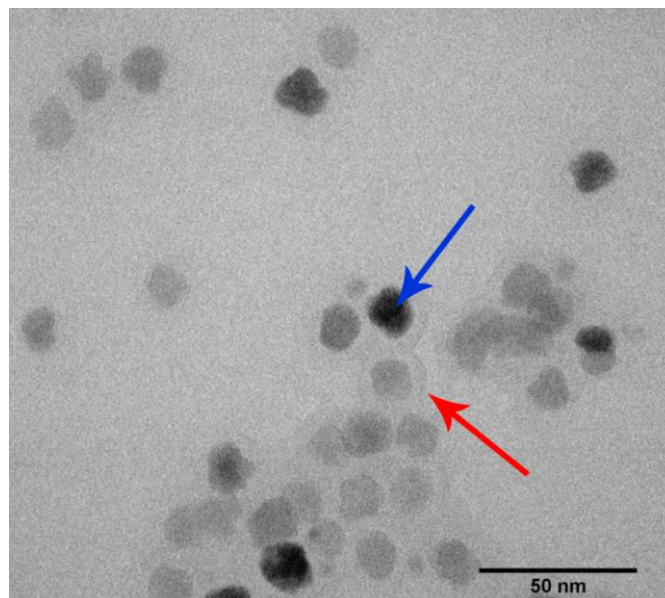
Además de la electroforesis se llevó a cabo un análisis termogravimétrico (TGA), que refleja la pérdida de masa de una muestra frente al aumento de temperatura (*Figura 8*). Se puede así obtener información acerca del recubrimiento orgánico que rodea las NPs. Se disponía de un TGA que se hizo anteriormente a las MNPs que se transfirieron a agua (NPs@oleico) y que permitió cuantificar la cantidad de ácido oleico que recubre las NPs: 10,28% del peso total. Con este dato y el TGA de las nanopartículas transferidas (NPs@oleico@PMAO-TAMRA) se calculó la cantidad de PMAO-TAMRA unido durante el proceso: 16,95% del peso total de las NPs.

Los resultados que aporta este análisis permiten calcular el número monómeros de PMAO-TAMRA que se unen a cada nanopartícula, y por tanto cuántos carboxilos poseen (cada monómero aporta 2 grupos carboxilo al hidrolizarse el grupo anhídrido). En este caso, se unieron  $1,90 \cdot 10^3$  monómeros por nanopartícula, lo que supone  $3,80 \cdot 10^3$  carboxilos que estabilizan y permiten las posteriores funcionalizaciones (ejemplo de cálculos en el anexo II).



**Figura 8.** Termograma de las NPs en medio orgánico (NPs@oleico, amarillo) y de las NPs transferidas a medio acuoso (NPs@oleico@PMAO-TAMRA, rojo).

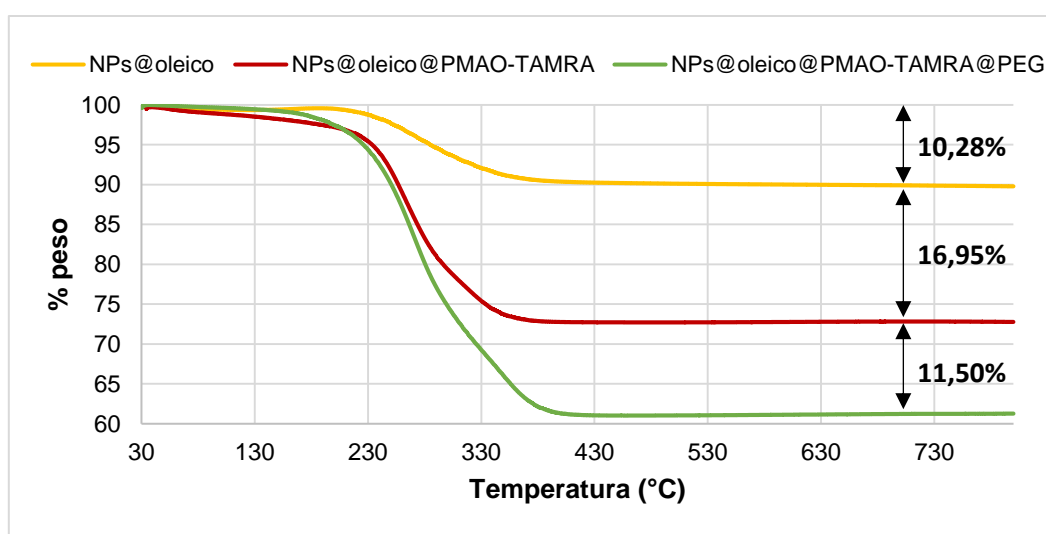
Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se puede observar el núcleo inorgánico de las NPs, pero también pudo apreciarse, con los aumentos correspondientes, la capa de polímero que lo recubre (Figura 9).



**Figura 9.** Nanopartículas recubiertas con PMAO-TAMRA observadas al microscopio electrónico de transmisión (TEM). Flecha azul, núcleo inorgánico. Flecha roja, polímero.

#### 4.1.2. Funcionalización con PEG y ciclooctino

Para conseguir unas nanopartículas compatibles con medios biológicos se requiere una funcionalización con agentes que impidan su agregación mediante, por ejemplo, repulsión estérica. La molécula escogida en este trabajo para realizar esta función es el PEG, pues en anteriores estudios del grupo se comprobó que daban buenos resultados.<sup>22,23</sup> El PEG utilizado tiene un peso molecular de 750 Da y posee un grupo metoxi en uno de sus extremos, y un grupo amina en el otro, que le permitirá reaccionar con los carboxilos del PMAO. Se añade en exceso en la reacción, y posteriormente se pueden cuantificar los carboxilos se han funcionalizado con la información que aporta un TGA.



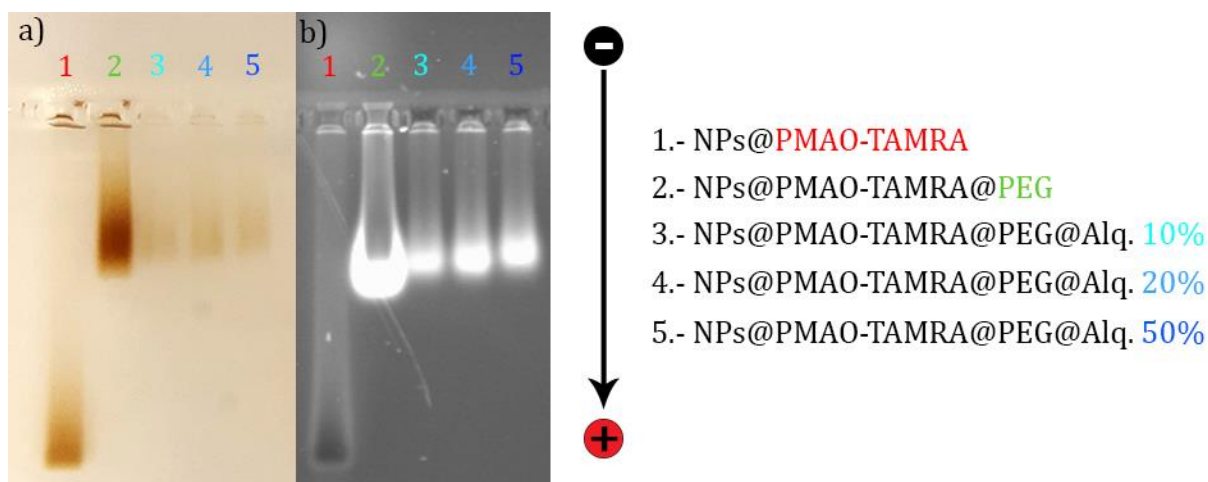
**Figura 10.** Termograma de las NPs en medio orgánico (NPs@oleico, amarillo), de las NPs transferidas a medio acuoso (NPs@oleico@PMAO-TAMRA, rojo) y de las NPs funcionalizadas con PEG (NPs@oleico@PMAO-TAMRA@PEG, verde).

El TGA indica que el PEG supone un 11,50% del peso total de la nanopartícula (*Figura 10*). Esto supone la unión de  $7,14 \cdot 10^2$  moléculas de PEG en cada nanopartícula, es decir, que se funcionalizaron el 18,79% de los carboxilos que poseían.

Se comprobó mediante el TGA mostrado y electroforesis (*Figura 11*) que la reacción había funcionado correctamente, y se avanzó al siguiente paso: funcionalización con ciclooctino. Esta molécula es necesaria para que se produzca la reacción *click* bioortogonal en las células. Dado que el objetivo del trabajo es valorar qué cantidad de ciclooctino es óptima para añadir a las NPs para conseguir el mayor rendimiento en el marcaje de membrana, se funcionalizaron distintos porcentajes de carboxilos iniciales: 10%, 20% y 50%. Cada una de las reacciones se llevó a cabo por separado.

No se realizó un TGA a las MNPs funcionalizadas con ciclooctino, pues es una técnica destructiva para la que se necesita una cantidad de muestra razonable, y el alquino tiene un elevado coste. Además, debido a que la molécula es pequeña, apenas se aprecia su pérdida de masa, según pruebas realizadas por el grupo con anterioridad.

La electroforesis de agarosa también permite analizar de manera sencilla la correcta funcionalización de las NPs con una cantidad de muestra muy inferior. Dado que el PMAO está cargado de forma negativa por sus grupos carboxilo, y son estos mismos grupos los que reaccionan con el grupo amino del PEG o del ciclooctino, la carga negativa se verá reducida, y por tanto también su movilidad electroforética en el gel.

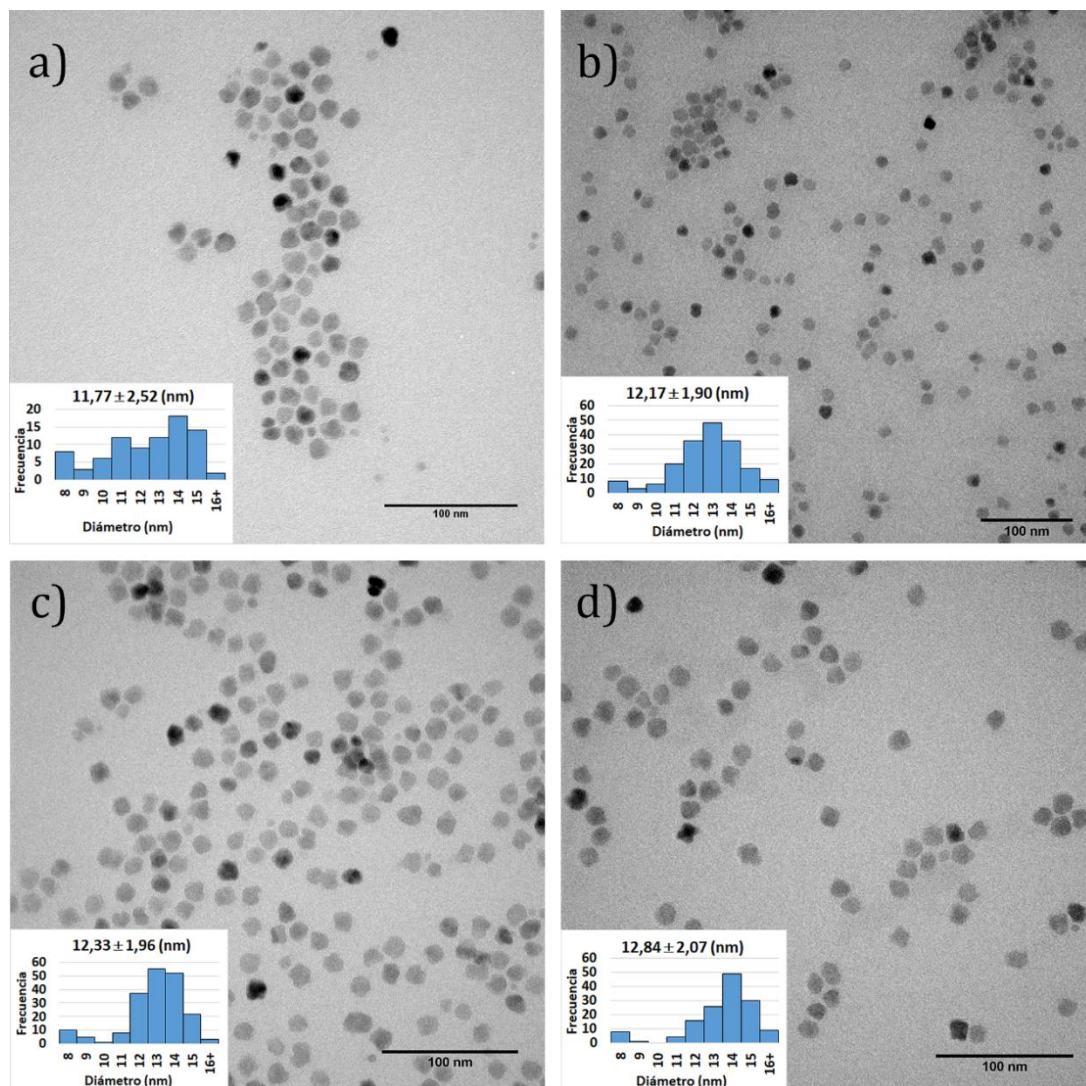


**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v). NPs del mismo lote. Progreso de la funcionalización. (a) Fotografía con luz visible. (b) Fotografía con luz UV. (1) NPs@PMAO-TAMRA; (2) NPs@PMAO-TAMRA@PEG; (3) NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq 10%; (4) NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq 20%; (5) NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq 50%.

La *Figura 11* muestra la migración electroforética de las distintas funcionalizaciones de NPs. Se observa una gran disminución en la migración tras la adición de PEG a las NPs. De forma más discreta, las NPs migran menos en el gel conforme se funcionalizan con mayor cantidad de ciclooctino.

En cada paso de modificación de las nanopartículas, se observaban al microscopio electrónico de transmisión, donde se apreciaba que el tamaño y la forma del núcleo inorgánico se mantenían. En la *Figura 12* se muestran las fotografías ordenadas de menor a mayor funcionalización.





**Figura 12.** Nanopartículas observadas al microscopio electrónico de transmisión en los distintos pasos de funcionalización: (a) NPs en medio orgánico, (b) NPs@PMAO-TAMRA, (c) NPs@PMAO-TAMRA@PEG, (d) NPs@PMAO-TAMRA@PEG@aliquino (10%). En las esquinas inferior izquierda, histograma de diámetros, y el tamaño medio  $\pm$  desviación estándar.

La técnica de dispersión dinámica de luz nos permite obtener el diámetro hidrodinámico medio de las partículas de la muestra. Esto es, su diámetro efectivo en solución que tiene en cuenta todas las moléculas de H<sub>2</sub>O que llevan consigo en su esfera de hidratación. Esta medida nos permite determinar el tamaño de la nanopartícula contando con su capa orgánica de funcionalización, apenas distinguible por microscopía electrónica, al verse únicamente el núcleo inorgánico. Por otra parte, el potencial Z mide la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa de fluido estacionario asociada a la partícula dispersa. Es un indicador de la estabilidad de una dispersión coloidal.

Muestra	Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)
NPs@PMAO-TAMRA	129 $\pm$ 3,05	-37,1 $\pm$ 1,29
NPs@PMAO-TAMRA@PEG	77,1 $\pm$ 0,87	-14,2 $\pm$ 0,91
NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq10	78,5 $\pm$ 1,14	-15,5 $\pm$ 0,71
NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq20	85,3 $\pm$ 1,36	-23,9 $\pm$ 0,87
NPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq50	86,7 $\pm$ 1,63	-19,5 $\pm$ 0,13

**Tabla 1.** Medidas de tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico, en nm) y potencial Z (mV). Media  $\pm$  desviación estándar. NPs del mismo lote. Datos en número.

Los resultados de la *Tabla 1* indican un gran salto de diámetro hidrodinámico entre las NPs basales, recubiertas únicamente con el polímero, y el resto. En las demás muestras, este parámetro se encuentra en unos valores más próximos entre sí. Esa variación podría explicarse por un cambio en la capa de solvatación de las nanopartículas debido a su funcionalización con la molécula de PEG. No obstante, en caracterizaciones anteriores de NPs similares por el grupo no se observa este gran cambio de tamaño al añadir PEG.<sup>24</sup> El resultado, por tanto, podría indicar agregación de la muestra. Para asegurarse de ello, y evitar que ocurra en futuras ocasiones, se recomienda sonicar la muestra brevemente inmediatamente antes de medirla.

Los resultados del potencial Z no corresponden del todo con lo esperado. Las sucesivas funcionalizaciones ocurren utilizando grupos carboxilo (COO<sup>-</sup>) del polímero PMAO, y por tanto reducen la carga neta superficial de la nanopartícula, que será menos negativa. Este efecto sí se observa tras la adición de PEG, con una reducción del potencial a más de la mitad. Sin embargo, en sucesivas funcionalizaciones no se observa variación o incluso, en contra de lo esperado, se vuelve más negativo. Las muestras utilizadas son las mismas que las analizadas mediante gel de electroforesis, donde el fenómeno se observa de forma clara. Se pueden asociar estas medidas a diferencias de pH entre las muestras. Para poder comparar el potencial Z de distintas muestras, éstas deben tener un pH similar. Debido a que la solución no está tamponada (las NPs están dispersas en agua milli-Q) y el volumen es pequeño (1-2 mL), el ajuste podría no haber sido óptimo.

A pesar de que los resultados del potencial Z no aportan la información buscada, se considera que las distintas funcionalizaciones transcurrieron con éxito, según deja ver el gel de electroforesis (*Figura 11*), al ser éste un ensayo menos sensible a la alteración por otros factores.

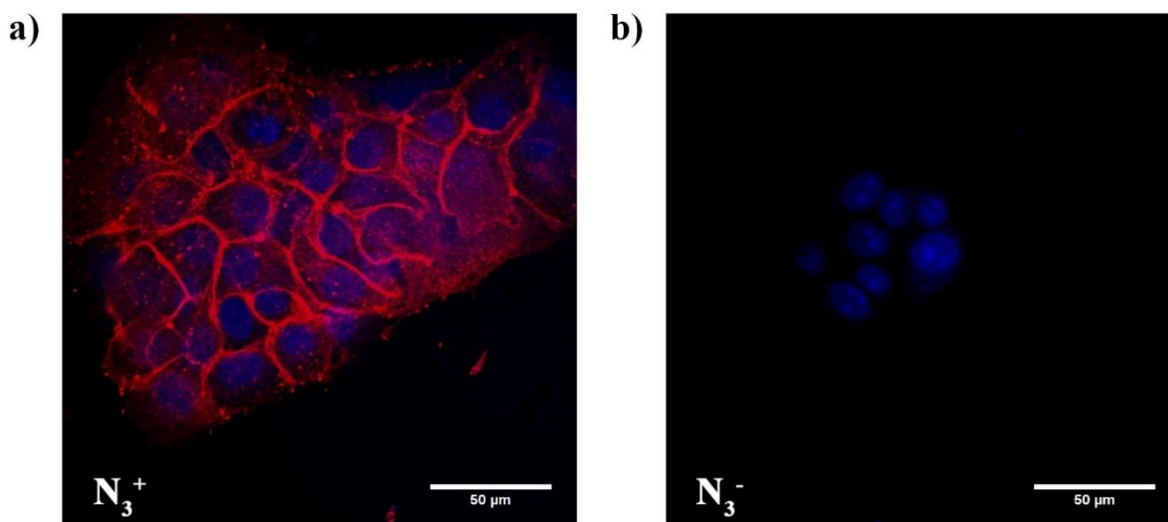
## 4.2. Marcaje de membrana

### 4.2.1. Marcaje con DBCO

Se pretende que las células (de la línea celular MCF-7) expresen en su glicocáliz grupos azida utilizando glicoingeniería metabólica. Para ello, se añadió al medio de cultivo Ac<sub>4</sub>ManNAz, un azúcar precursor de un ácido siálico modificado, para que fuera procesado y expuesto en la superficie externa de la membrana plasmática. Estos grupos N<sub>3</sub> permiten llevar a cabo reacciones de química *click* biortogonal con moléculas que posean un alquino tensionado, como el ciclooctino. El DBCO cumple con esta característica. Está compuesto por un grupo dibencilciclooctino (que se unirá al grupo azida), y sulforodamina B, un fluoróforo que hará posible su detección con microscopía confocal ( $\lambda_{\text{abs}}$  a 568 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  a 585 nm).

El proceso seguido para el marcaje con DBCO es idéntico al utilizado con las nanopartículas, y sirve como control del correcto funcionamiento de la reacción *click* en la membrana plasmática de las células.

La *Figura 13* muestra que el marcaje de membrana transcurrió correctamente, y toda unión del DBCO fue debida a su reacción con los grupos azida de la membrana plasmática. En el control, negativo, en el que las células no fueron tratadas con Ac<sub>4</sub>ManNAz, no se detectó señal en el canal rojo, donde se registra el DBCO. Esto implica que toda la molécula fluorescente fue retirada en los lavados de las células tras el tratamiento, y que no había ninguna interacción fuerte inespecífica entre la misma y las células.



**Figura 13.** Fotografías de microscopía confocal, con las células tratadas (a) con ( $N_3^+$ ) o (b) sin ( $N_3^-$ )  $Ac_4ManNAz$ . Ambas se incubaron posteriormente durante 1 hora a  $37^\circ C$  con DBCO.

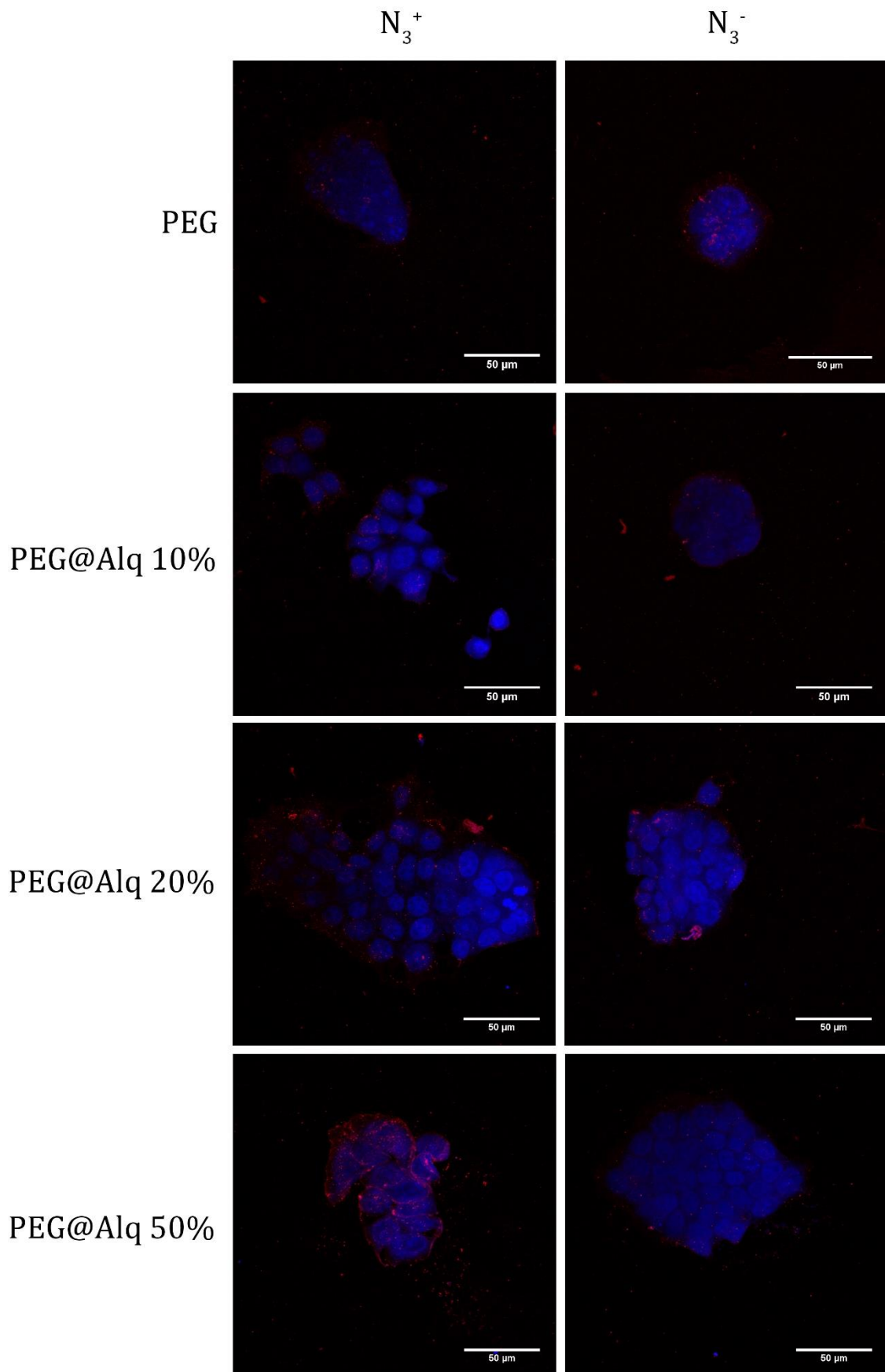
#### 4.2.2. Unión de nanopartículas magnéticas

La prueba realizada con el DBCO permitió cerciorarse de que las células presentaban el grupo azida en su glicocáliz correctamente, y que éste era accesible al alquino tensionado para su reacción, que se produjo con éxito. Se esperaba que las nanopartículas funcionalizadas con una molécula de ciclooctino hubieran adquirido esa especificidad por la membrana, pudiendo adherirse a ella covalentemente mediante la misma reacción que permitió el marcaje con DBCO.

Se utilizaron las nanopartículas sintetizadas y funcionalizadas tal y como se ha descrito anteriormente: con PEG, y con un 10%, 20% o 50% de los carboxilos iniciales funcionalizados con ciclooctino. Se usaron también MNPs sin ciclooctino.

Los resultados (*Figura 14*) muestran una creciente afinidad por la membrana conforme aumenta la cantidad de ciclooctino con el que se funcionalizaron las nanopartículas. Tanto en los controles negativos de  $Ac_4ManNAz$  ( $N_3^-$ ) como en las NPs de PEG con  $N_3^+$  se observa cierta unión inespecífica a las células y al cubreobjetos. En las NPs con más ciclooctino (20% y 50%) se observa una mayor afinidad, pudiendo distinguir fácilmente la forma de la membrana celular con las MNPs con ciclooctino 50%, que recuerda al marcaje obtenido con el DBCO. Es clara la influencia de la molécula con alquino en la unión de las nanopartículas a la membrana celular cuando éstas presentan grupos azida en su glicocáliz. No obstante, es conveniente una mayor optimización del protocolo de incubación y lavado para reducir o eliminar la unión inespecífica de nanopartículas al cubreobjetos y las células. Así, se podría confirmar con mayor certeza el papel del ciclooctino en la fijación de las NPs a la membrana. Una propuesta es la incorporación de algún tipo de detergente suave a uno de los pasos de lavado tras la incubación con NPs.

La tinción con DAPI no funcionó correctamente, y además del núcleo también se encontró en el citoplasma. Sin embargo, esto no es relevante para el marcaje de membrana con NPs, de la misma forma que no lo fue para el marcaje con DBCO.



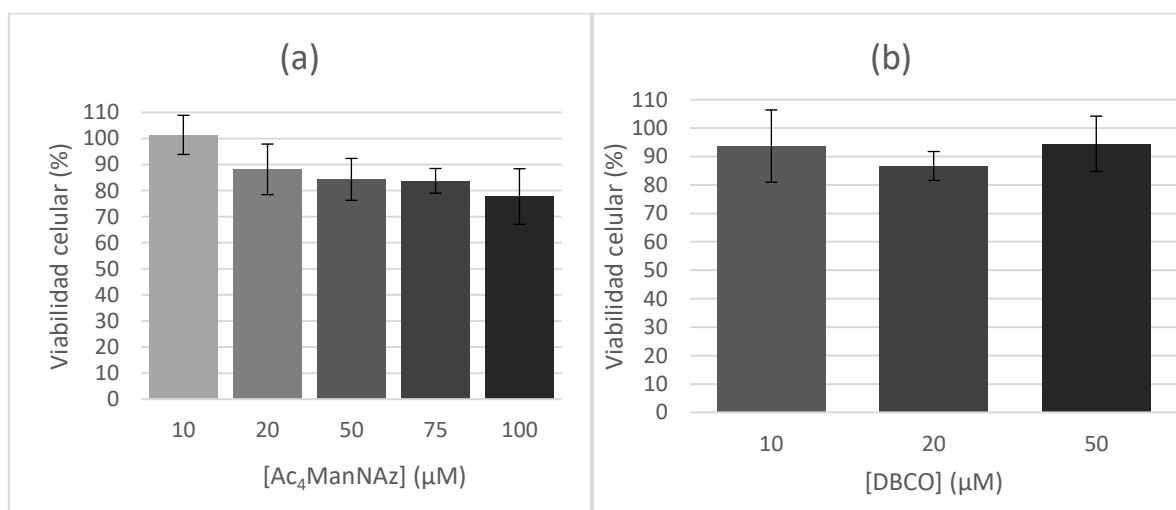
**Figura 14.** Fotografías de microscopía confocal, con las células tratadas con ( $N_3^+$ ) o sin ( $N_3^-$ )  $Ac_4ManNAz$ . Se añadió nanopartículas funcionalizadas con sólo PEG (**PEG**), PEG y ciclooctino 10% (**PEG@Alq 10%**), PEG y ciclooctino 20% (**PEG@Alq 20%**), y PEG y ciclooctino 50% (**PEG@Alq 50%**). Barra: 50  $\mu m$ .

En vista de los resultados obtenidos en este experimento, se decide continuar trabajando únicamente con las NPs funcionalizadas con PEG y ciclooctino 50%, pues el marcaje ha sido exitoso, las NPs son estables y no agregan ni precipitan en medio de cultivo, y se aprecia una clara diferencia entre las células con azida y sin él. También se sugiere una mayor optimización del proceso, para aumentar la especificidad de la reacción y la diferencia observada entre las células que han sido tratadas con Ac<sub>4</sub>ManNAz y las que no. En anteriores trabajos del grupo se ha hipotetizado que, debido a la longitud de las moléculas de PEG con respecto a las de ciclooctino, estas primeras pueden ocultar el alquino, haciéndolo no accesible a las azida.<sup>22</sup> Una posible solución sería el aumento de longitud en la cadena del ciclooctino, que lo igualara al PEG, aumentando así la eficiencia de la reacción *click* en este proceso.

### 4.3. Viabilidad celular

#### 4.3.1. Citotoxicidad de Ac<sub>4</sub>ManNAz y DBCO

Se estudió efecto citotóxico del Ac<sub>4</sub>ManNAz y el DBCO, las dos sustancias con las que se incubaron las células para el marcaje de membrana. Se realizó un ensayo de MTT con la línea celular MCF-7, la misma que se utiliza para experimentos posteriores. En el caso del Ac<sub>4</sub>ManNAz, se probaron concentraciones de 10, 20, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ , y para DBCO se utilizaron concentraciones de 5, 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$ . Las células se incubaron durante 24 horas en ambos casos.



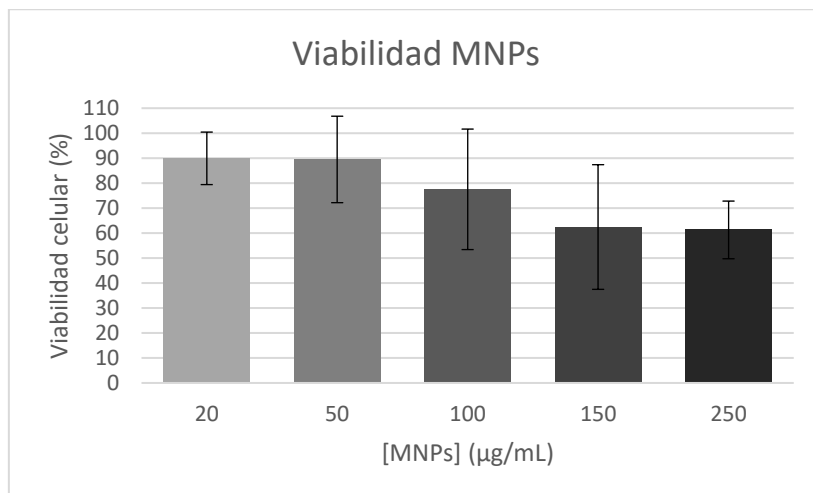
**Figura 15.** Citotoxicidad de (a) Ac<sub>4</sub>ManNAz y (b) DBCO a diferentes concentraciones, determinada por ensayo de MTT. Período de incubación de 24 horas en células MCF-7.

El azúcar utilizado para glicoingeniería metabólica presentó reducción en la viabilidad celular a partir de una concentración de 20  $\mu\text{M}$  (viabilidad del 88,16%), y se reduce hasta 77,72% con 100  $\mu\text{M}$ . La concentración que se utilizará para el marcaje de membrana, 50  $\mu\text{M}$ , obtuvo una viabilidad del 84,30%, considerada aceptable (Figura 15a). Además, en anteriores ocasiones se demostró que la incubación con Ac<sub>4</sub>ManNAz no daña la membrana<sup>22</sup>, por lo que lo que refleja el ensayo de MTT puede ser una reducción de la actividad metabólica al añadir el azúcar.

Los resultados obtenidos para el DBCO en el ensayo no son concluyentes (Figura 15b). Para una concentración de 5  $\mu\text{M}$  obtenemos una viabilidad de 151,88% (no mostrada en la gráfica), y la tendencia observada no parece obedecer un patrón. Existe la posibilidad de que algunas células incorporen la molécula de DBCO y que ésta interfiera en la medida. Se desconoce la razón exacta de la aleatoriedad de los resultados. Por ello, y debido a que sólo se realizó el ensayo una vez, no se pueden extraer conclusiones del mismo.

### 4.3.2. Citotoxicidad de NPs

Se determinó la viabilidad de las células incubadas 24 horas en distintas concentraciones de MNPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq. 50%. Son las nanopartículas que han mostrado mejor unión y fijación a la membrana plasmática en los ensayos, y por tanto las que se utilizarán en posteriores estudios y aplicaciones. Se realizó un ensayo por triplicado, con concentraciones de 20, 50, 100, 150, 250  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 16.** Citotoxicidad de MNPs@PMAO-TAMRA@PEG@Alq. 50% a diferentes concentraciones, determinada por ensayo de MTT. Periodo de incubación de 24 horas en células MCF-7.

El ensayo de viabilidad por MTT muestra una disminución de la misma conforme aumenta la concentración de NPs (Figura 16). La viabilidad con una concentración de NPs de 100  $\mu\text{g/mL}$  es de 77,52%. Esta es la condición en la que se incuban las células para el marcaje de membrana; en éste, no se observan cambios significativos tras la incubación, aunque ésta dura 1 hora, frente a las 24 horas del ensayo con MTT. Sin embargo, las desviaciones típicas de los puntos intermedios son muy elevadas, por lo que se precisa la repetición del ensayo para poder extraer resultados concluyentes.

## 5. CONCLUSIONES

### ESPAÑOL

En este trabajo se han preparado nanopartículas magnéticas de óxido de hierro esféricas con un diámetro de 12 nm para aplicaciones en reacciones de química *click* bioortogonal. La transferencia a agua mediante recubrimiento con el polímero anfifílico PMAO, asociado con el fluoróforo TAMRA, se llevó a cabo con éxito, al igual que la funcionalización con PEG y las distintas cantidades de ciclooctino (el 10%, 20% y 50% de los carboxilos iniciales). Todas las MNPs eran estables en medio acuoso y no mostraban signos de agregación.

Mediante glicoingeniería metabólica, las células de la línea MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) expusieron correctamente grupos azida en su glicocálix, como se comprobó con la adecuada unión específica del DBCO a las células tratadas con Ac<sub>4</sub>ManNAz. Esto permitió valorar la capacidad de unión específica de las MNPs funcionalizadas con ciclooctino a la membrana. La fijación era mayor cuanto más ciclooctino contenían las NPs, siendo aquellas que presentaban un 50% de sus carboxilos iniciales funcionalizados con ciclooctino las que mejor se unían a la membrana, con ligera unión inespecífica. Al ser las que mejor resultado han mostrado, se podrán utilizar estas NPs en futuros experimentos. No obstante, en futuros marcajes de membrana se recomienda un lavado más intenso de las MNPs para evitar las uniones no provocadas por la reacción *click*. Asimismo, se sugiere un aumento de

la longitud de la cadena del ciclooctino para que éste no quede oculto por las moléculas de PEG y así quizás aumentar el rendimiento del proceso.

También se ha evaluado la citotoxicidad del Ac<sub>4</sub>ManNAz, DBCO y MNPs mediante el ensayo con MTT. En ninguno de los tres casos se pueden extraer conclusiones certeras, pues sólo se realizó cada experimento una vez y se requiere un estudio más amplio utilizando distintas técnicas además del MTT (generación de especies reactivas de oxígeno, activación del sistema del complemento, ciclo celular, etc.).

## ENGLISH

In this work, 12 nm spherical iron oxide magnetic nanoparticles were functionalized for biorthogonal click chemistry applications. The MNPs were successfully transferred into water using an amphiphilic polymer (PMAO) associated with a fluorophore (TAMRA). The MNPs were further successfully functionalized with PEG and different amounts of cyclooctyne (10%, 20% and 50% of the initial carboxyl groups). All MNPs were stable in aqueous media and did not show any signs of aggregation.

Using metabolic glycoengineering, azide groups were correctly introduced in the glycocalyx of MCF-7 (human mammary adenocarcinoma) cells, confirmed by the adequate specific union of DBCO to the Ac<sub>4</sub>ManNAz treated cells. This allowed testing that the cyclooctyne functionalized MNPs had the capacity to attach to the plasma membrane in a specific manner. The ability of the MNPs to covalently attach to the cell membrane was directly proportional to the percentage of alkyne on their surface. Thus, MNPs having 50% of the initial carboxyl groups functionalized by cyclooctyne were found to be better candidates for future experiments, as they also showed low unspecific union. However, a more thorough washing step of the MNPs is recommended in order to avoid any union that is not due to the *click* reaction. Likewise, using a cyclooctyne with a longer chain is suggested, in order to prevent PEG molecules from partially blocking the union to the azide groups and to improve the efficiency of the click reaction.

The cytotoxicity of Ac<sub>4</sub>ManNAz, DBCO and MNPs was also evaluated with a MTT assay. None of the three experiments was conclusive, as each one was only performed once. A further, more extensive study using different experiments (reactive oxygen species generation, complement activation, cellular cycle, etc.) are required.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Zrazhevskiy, P., Sena, M. & Gao, X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4326 (2010).
2. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine - challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 872-97 (2009).
3. Roduner, E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 583 (2006).
4. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400-6411 (2014).
5. Hervault, A. & Thanh, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **6**, 11553-11573 (2014).
6. Goya, G. F., Asín, L. & Ibarra, M. R. Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: Current state and perspectives. *Int. J. Hyperth.* **29**, 810-818 (2013).
7. Osaci, M., Abrudean, C. & Berdie, Relaxation Times in Magnetic Nanoparticles System and Memory Effects. *Acta Phys. Pol.* **112**, 1203-1212 (2007).

8. Blanco-Andujar, C. *et al.* Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. *Nanomedicine* **11**, 121-136 (2016).
9. Chatterjee, D. K., Diagaradjane, P. & Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2**, 1001-1014 (2011).
10. Shakil, A., Osborn, J. L. & Song, C. W. Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**, 859-865 (1999).
11. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release* **65**, 271-284 (2000).
12. Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 131-135 (2011).
13. Lee, S. *et al.* Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry. *ACS Nano* **8**, 2048-2063 (2014).
14. Ohtake, M. *et al.* Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment. *Sci. Rep.* **7**, 42783 (2017).
15. Jewett, J. C. & Bertozzi, C. R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1272 (2010).
16. Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13-21 (2005).
17. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046-15047 (2004).
18. Koo, H. *et al.* Bioorthogonal copper-free click chemistry inVivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 11836-11840 (2012).
19. Yoon, H. Y., Koo, H., Kim, K. & Kwon, I. C. Molecular imaging based on metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. *Biomaterials* **132**, 28-36 (2017).
20. Shouheng Sun, Hao Zeng, David B. Robinson, Simone Raoux, Philip M. Rice, Shan X. Wang, and G. L. Controlled Synthesis of MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ( M = Mn , Fe , Co , Ni and Zn ) Nanoparticles. *J.Am.Chem.Soc.* **126**, 273-279 (2004).
21. Moros, M. *et al.* Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* **2**, 1746 (2010).
22. Idiago López, F. J. Magnetic nanoparticles covalently immobilized on cell surfaces for magnetic hyperthermia studies. (Universidad de Zaragoza, 2016).
23. Moros, M. *et al.* Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: Influence in the cellular uptake. *ACS Nano* **6**, 1565-1577 (2012).
24. Navascuez Lominchar, M. Química click bioortogonal como herramienta para la inmovilización de nanopartículas magnéticas en superficies. (Universidad de Zaragoza, 2016).