



Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales
Área de Química Física
Universidad Pablo de Olavide

Programa de Doctorado en
Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química

*Nuevas nanopartículas metálicas conjugadas con
agentes terapéuticos y ligandos proteicos dirigidos a
receptores EGFR, para la terapia selectiva contra el
cáncer*

Memoria que presenta

José María Oliva Montero

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide

Director de Tesis:
**Dra. Ana Paula Zaderenko
Partida**
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Sistemas Físicos,
Químicos y Naturales
Universidad Pablo de Olavide

Sevilla, 2018

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral asociada al Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía denominado *“Nuevas nanopartículas metálicas conjugadas con agentes terapéuticos y ligandos proteicos dirigidos a receptores EGFR, para la terapia selectiva contra el cáncer”* (Código P10-FQM-6615).

Agradecimientos

Al final de cada camino sólo importa una cosa: las memorias. Éstas pueden ser llenas o vacías. Las memorias vacías no son nada, pero ocupan un hueco. Los huecos pesan, aunque su peso es negativo.

Las memorias llenas son agradables o desagradables. Algunas veces su clasificación es complicada. En sí mismas no son ni buenas ni malas, pues suelen ser independientes de su causa y/o de su efecto. Las memorias son lo único que queda al final de un camino y deben ser importantes pues definen lo que eres, lo que fuiste y lo que puedes ser.

A mis padres,
gracias por el regalo de la vida,
y por enseñarme todas esas cosas
que no aparecen en los libros.

Sólo una cosa es más dolorosa que aprender de la experiencia y es, no aprender de la experiencia.

Laurence Johnston Peter

Una tesis es una recopilación de experiencias previstas, ordenadas, evaluadas y justificadas que siguen unas reglas, las reglas del método científico. De lo que se ve, la mayor parte quedará perpetuo en el tiempo en las páginas que proceden a este pensamiento. A lo que no se ve, a lo que no se palpa, van dedicadas estas primeras páginas. Tan importantes, o más si cabe, como los resultados o las conclusiones de estos intensos años pues fueron, son y serán el más preciado tesoro de mis años de doctorando.

A Paula Zaderenko, por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, por abrirme las puertas del laboratorio como si fuera mi casa, por hacerme sentir parte de su familia. Gracias por iluminarme este sendero que es la ciencia.

A los “Zeolitos”, por esos buenos ratitos sobre filosofía del todo y desternillantes debates sobre lo mundano. Gracias por hacerme sentir uno más del grupo de los “disimuladores”.

A Julio Pérez, por aguantarme en mis días grises y en mis momentos de subidón estratosférico. Mil y una historias divertidas quedaran para nuestro recuerdo aquí, cruzando fiordos en el borde de la Tierra o cazando fantasmas nocturnos en el bosque.

Al barco CTS-480, capitaneado por Mercedes F. Arévalo, por abrirme los ojos a lo pequeño con aquella misteriosa ciencia que llamaban Nanotecnología.

A Dani Ruiz, gracias por haberme transmitido esa energía científica en mis inicios y sobre todo por haber visto en mí un científico cuando ni yo sentía que lo fuera.

A Javier Moreno Onorato, gracias por enseñarme que lo clásico puede ser moderno y que la buena ciencia exige el estudio profundo, el pensamiento dedicado y el trabajo riguroso. Gracias a todo el departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de Sevilla, fuisteis mi primera gran familia científica. Gracias a Reme, por esas risas y sobre todo por

encubrirme cuando rompía cosas. Paula Daza, gracias por haber estado ahí en aquellas decisiones que han hecho posible hacer realidad este momento.

A Manuel de Miguel y a Tamara, por todos esos buenos ratos mientras me enseñabais con infinita paciencia y vocación a trabajar con los ratones. Gracias por vuestro cariño y consejo más allá de los confines de lo académico. Un pedacito de mi está en el Macarena.

A la gente del CABD, por aguantarme, especialmente a José Antonio Sánchez y a la gente del Lab 210. Sin ustedes no habría podido hacer nada de “celulitas”. Nunca podré pagaros todos esos medios de cultivo suplementados que gasté en infinitos experimentos. A Katy, Leslie y Corín, por soportarme en todos los *training* que me hacías repetir por que no daba ni una a primeras con los microscopios. Ya no tendréis que aguantar mis “nanocosas peligrosas” en vuestros equipos supersensibles.

A la gente de láseres: Ana, Paco, JR y Ana Q, por todos aquellos cafés de maquinita con poca azúcar y extra de chismes. Sois mis hermanos mayores científicos.

A mis compañeros de lucha, a todos los que formasteis filas conmigo en la cruzada diaria por el conocimiento en este batallón que integramos el grupo Nano de la UPO. Todos vosotros dejasteis un pedacito vuestro dentro de mí para ser lo que hoy soy. Carlos, Vane y Julio, con ustedes empezó todo. Fátima, Laura, Alex, mis primeros niños de grado tutelados. Matthew, Dominick y Francesca, el mundo ahora resulta más pequeño. Leti y María Jesús, no olvidéis que fui vuestro mentor aunque me vieseis como el sombrerero loco. A Laura, Raúl, Samu, Alegría, Juanma y a todos los que llegasteis cuando ya empezaba a perder la cabeza, gracias.

A Antonio Franconetti, por tantos años de compañero de piso, de cafés y de cervezas con ciencia y sin ciencia. Gracias por recordarme que nos hace ser o no ser científicos.

A Joaquín, mi primo con funciones merecidas de hermano mayor, gracias por estar ahí siempre, siempre, siempre, desde antes de que tuviese memoria. La vida es eso que pasa mientras nos empeñamos en hacer otros planes.

A “los normales del sur”: Isa, Jose, Ángela, Mariola, Pony, Julio. Por todos esos buenos momentos fuera del lab aunque terminásemos hablando del lab.

A mi familia roteña, gracias por acogerme como uno más, literalmente, en vuestra familia.

A Jessica, compañera de viaje, gracias por llenar de luz y de alegría cada uno de los rincones de esta vida. Terminamos una etapa juntos. Ahora nos toca empezar otra, con nuestra maleta cargada de sueños y la ilusión por algo nuevo que comienza.

Índice

Agradecimientos	III
Índice	XIII
Índice de figuras	XXI
Índice de tablas	XXV
Abreviaturas y acrónimos	XXVII
Resumen	1

Capítulo 0

Nanopartículas plasmónicas en biomedicina oncológica

Nanotecnología, nanomedicina y terapéutica	5
Nanotecnología	5
Nanomedicina	8
Áreas de aplicación de la Nanomedicina	9
Nanotransportadores en Nanomedicina	12
Nanopartículas plasmónicas, propiedades y aplicaciones en nanomedicina	15
Propiedades ópticas de las nanopartículas plasmónicas	15
Resonancia de plasmón de superficie localizado	16
Síntesis química de nanopartículas plasmónicas	20
Funcionalización de nanopartículas plasmónicas	22
Estabilidad coloidal de las nanopartículas plasmónicas	23
Tamaño y grado de hidrofilia de nanopartículas plasmónicas	25
Toxicidad de las nanopartículas plasmónicas	26
Nanopartículas plasmónicas en la terapéutica del cáncer	31
Cáncer	31
Transporte pasivo de nanopartículas	32
Efecto del aumento de permeabilidad y retención	33
Biodistribución y aclaramiento plasmático de las nanopartículas	35
Direccionamiento activo de fármacos	35
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	36
Nanopartículas plasmónicas en la clínica del cáncer	37

Capítulo 1

Materiales y Métodos

Síntesis, funcionalización y caracterización de las nanopartículas	45
▪ Materiales	45
▪ Síntesis de nanopartículas	45
▪ Espectroscopía de UV-Vis para el estudio del plasmón superficial	50
▪ Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	50
▪ Microscopía electrónica y análisis microestructural	50
▪ Estabilidad coloidal y diámetro hidrodinámico	51
▪ Estudio de estabilidad coloidal frente a pH	51
▪ Evaluación de la estabilidad con agentes de recubrimiento	51
Estudios de actividad en modelos celulares	52
▪ Evaluación de la expresión de dianas moleculares en cultivo celular	52
▪ Ensayos de entrada mediada y no mediada por receptor	52
▪ Evaluación de la viabilidad celular / citotoxicidad. Ensayo Alamar Blue [®]	53
▪ Estimación de la carga de DNA. Ensayo en gel de retardo	53
Evaluación de las nanopartículas en modelo animal	54
▪ Inoculación y caracterización del modelo tumoral	54
▪ Inoculación del sistema Ag@APY en ratonas BALB/c	55
▪ Medida del tumor	55
▪ Estudio histopatológico	55

Capítulo 2

Síntesis *in situ* de nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina

Resumen	59
Antecedentes	61
Resultados y discusión	63

Desarrollo de un método rápido y en un solo paso de obtener nanopartículas de plata altamente funcionalizadas con cisteamina	63
▪ El sistema coloidal Ag@NH ₂ presenta óptima estabilidad en un amplio rango de pH, incluido el fisiológico	67
▪ La espectroscopía FTIR demuestra la adecuada funcionalización superficial de la cisteamina en las Ag@NH ₂ .	69
▪ Ag@NH ₂ es un coloide esférico, altamente monodisperso, estable y funcionalizado en un 10% en peso cisteamina/plata	70
Comportamiento biológico de Ag@NH ₂ vectorizadas a células con sobreexpresión de EGFR	76
Conclusiones	81

Capítulo 3

Nanopartículas de oro funcionalizadas con 4,6-dimino-2-mercaptopirimidina

Resumen	85
Antecedentes	86
Resultados y discusión	91
Desarrollo de un sistema coloidal de AuNPs funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (Au@APY)	91
▪ El análisis por TEM, STEM y EDX muestra que Au@APY es cristalino, de reducido tamaño, altamente monodisperso y extensamente recubierto en derivado orgánico	94
▪ El análisis FTIR de Au@APY demuestra que el derivado orgánico está anclado a la superficie por el grupo tiol dejando libre los grupos amino	97
▪ El estudio por DLS de Au@APY presenta un sistema coloidal de pequeño diámetro y elevado ζ	99
▪ El sistema Au@APY presenta elevada estabilidad en un amplio rango de pH, incluido el fisiológico	100
▪ La BSA es un excelente agente de recubrimiento para el sistema Au@APY	101
Au@APY demuestra propiedades excepcionales en ensayos <i>in vitro</i>	105
▪ El Acoplamiento de anti-EGFR a Au@APY de forma dirigida es clave	105
▪ Au@APY no presentan citotoxicidad a las dosis estudiadas	107
▪ Las Au@APY son endocitadas en mayor medida por las células que sobreexpresan EGFR	109

El Sistema Au@APY es idóneo para transfectar y expresar DNA plasmídico	111
▪ El ensayo de retardo en gel para Au@APY muestra una buena capacidad de carga de DNA	112
▪ El sistema de transfección optimizado, basado en Au@APY, no presenta citotoxicidad	113
▪ La relación expresión de pGFP / toxicidad de nuestro sistema es muy superior a la de los sistemas convencionales	115
Conclusiones	119

Capítulo 4

Nanopartículas de plata funcionalizadas con 4,6-dimino-2-mercaptopirimidina

Resumen	123
Antecedentes	125
Resultados y discusión	129
Síntesis y caracterización de AgNPs funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (Ag@APY)	129
Funcionalización con anti-EGFR mediada por carbodiimidas	131
La citotoxicidad de Ag@APY varía en función del tipo celular, agente de recubrimiento, así como de su direccionamiento a EGFR	133
A dosis bajas Ag@APY disminuye el tamaño de los tumores en un modelo murino de cáncer de mama en ratonas BALB/c	140
Conclusiones	149

Capítulo 5

Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido tánico

Resumen	153
Antecedentes	155
Resultados y discusión	161
El TA controla el crecimiento de las AgNPs obteniéndose coloides monodispersos, estables y altamente funcionalizados con el polifenol	161
El nanosistema Ag@TA presenta buena estabilidad coloidal y un reducido diámetro hidrodinámico	164
La espectroscopía FTIR revela la correcta funcionalización superficial de las nanopartículas Ag@TA	165

Las Ag@TA son hidrodinámicamente estables en un amplio rango de pH, así como en medio de cultivo	166
Ag@TA presenta mayor citotoxicidad en células tumorales y tumorales con elevada expresión de EGFR que en las sanas	169
Conclusiones	175
Capítulo 6	
Conclusiones generales	
Conclusiones Generales	177
Referencias	181
Anexo 1	199

Índice de figuras

Figura 1. Copa de Licurgo bajo luz reflejada (izquierda) y luz transmitida (derecha).	6
Figura 2. Relaciones de tamaño en la nanoescala.	7
Figura 3. Efecto de superficie o efecto del tamaño.	8
Figura 4. Esquema de sistema teragnóstico basado en nanopartículas en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	11
Figura 5. Clasificación de los nanotransportadores por generaciones en función de los retos conseguidos.	13
Figura 6. Comportamiento electromagnético de las nanopartículas plasmónicas.	16
Figura 7. Factores que afectan a la síntesis de nanopartículas plasmónicas.	21
Figura 8. Estrategias más comunes en la funcionalización de nanopartículas plasmónicas para aplicaciones biomédicas.	22
Figura 9. Representación esquemática de los modos de estabilización de nanopartículas.	24
Figura 10. Relación entre la capa de solvatación y el ζ .	25
Figura 11. Mecanismos de citotoxicidad promovidos por nanopartículas metálicas.	28
Figura 12. Diferentes funciones de las nanopartículas plasmónicas en la terapia del cáncer.	38
Figura 13. Esquema de los potenciales usos biomédicos de nanopartículas plasmónicas en función de sus propiedades físico-químicas.	39
Figura 14. Metodología general de síntesis de nanopartículas plasmónicas desarrolladas en esta tesis.	46
Figura 15. Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de plata/cisteamina a diferentes tiempos de reacción (5-30 min).	64
Figura 16. Espectros de absorción de los productos obtenidos usando agua (línea discontinua) o DMF (línea continua) como disolvente, después del proceso de purificación.	65
Figura 17. Proceso de síntesis y purificación de Ag@NH ₂ .	66
Figura 18. Representación esquemática de la conformación gauche (A) y trans (B) de la cisteamina sobre la superficie de las nanopartículas de plata funcionalizadas para la síntesis en agua y DMF.	67
Figura 19. Espectros de UV-Vis de Ag@NH ₂ resuspendidas en agua a diferentes valores de pH.	68
Figura 20. Comparación entre los espectros FTIR de Ag@NH ₂ sintetizado en DMF antes (línea azul) y después (línea negra) del proceso de diálisis.	69
Figura 21. Comparativa entre los espectros FTIR de las nanopartículas Ag@NH ₂ sintetizadas en DMF antes (línea gris) y después (línea negra) de dializar.	70
Figura 22. Caracterización microestructural de las nanopartículas Ag@NH ₂ .	71
Figura 23. Distribución de tamaño hidrodinámico (HD) de Ag@NH ₂ calculado por DLS.	71
Figura 24. Análisis composicional de Ag@NH ₂ .	73
Figura 25. Análisis del perfil Ag/S para Ag@NH ₂ .	74

Figura 26. Superficie accesible al solvente de la tiopronina y la cisteamina que muestra el volumen excluido inducido por estas moléculas.	75
Figura 27. Esquema representativo de la funcionalización de Ag@NH ₂ con el anticuerpo anti-EGFR marcado con AlexaFluor488 (Ag@NH ₂ @Ab).	77
Figura 28. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@NH ₂ medida usando el ensayo AlamarBlue®.	78
Figura 29. Imágenes de microscopía de células A431 incubadas con nanopartículas Ag@NH ₂ @Ab.	79
Figura 30. Esquema representativo de las diferentes aplicaciones de las AuNPs en la terapéutica del cáncer.	87
Figura 31. Representación de la orientación del anticuerpo sobre la nanopartícula en función del tipo de unión.	88
Figura 32. Representación ideal de un tejido tumoral al que se han vectorizado AuNPs para EGFR.	89
Figura 33. Representación esquemática del método de síntesis para Au@APY.	92
Figura 34. Fotografías representativas de los distintos estadios intermedios durante el proceso de síntesis de Au@APY.	93
Figura 35. Espectro de UV-Vis del coloide resultante para la síntesis de las nanopartículas Au@APY.	93
Figura 36. Microcaracterización de Au@APY.	94
Figura 37. Microcaracterización y microanálisis de la suspensión coloidal de nanopartículas Au@APY.	96
Figura 38. Espectros FTIR de APY (línea morada) y Au@APY (línea negra).	98
Figura 39. Ensayo de estabilidad de Au@APY a diferentes pH (2-9).	101
Figura 40. Espectros UV-Vis de las suspensiones acuosas de Au@APY tras recubrir con diferentes polímeros.	102
Figura 41. Espectros UV-Vis de las nanopartículas funcionalizadas con BSA a diferentes concentraciones tras haber sido sometidas a un choque iónico.	104
Figura 42. Imágenes TEM de Au@APY recubiertas con BSA a dos magnificaciones diferentes (a y b).	105
Figura 43. Representación esquemática de la unión covalente de los anti-EGFR a las nanopartículas Au@APY.	106
Figura 44. Espectros UV-Vis de la conjugación Au@APY-anti-EGFR, evidenciando un desplazamiento del LSPR tras el acoplamiento del anticuerpo.	107
Figura 45. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Au@APY en diferentes líneas celulares.	108
Figura 46. Entrada de anti-EGFR marcado con Alexa Fluor 488 (verde) a diferentes tiempos en la línea celular A431.	109
Figura 47. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células A431 incubadas con Au@APY-anti-EGFR a las 3h tras la incubación con Au@APY-aEGFR.	110
Figura 48. Imágenes de células A431 incubadas con Au@APY tomadas en un microscopio de campo oscuro.	111
Figura 49. Ensayo de condensación de pDNA por Au@APY.	113
Figura 50. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Au@APY frente al polimérico catiónico PEI+NaCl en la línea celular H460.	114

Figura 51. Ensayo de viabilidad AlamarBlue [®] del sistema de transfección Au@APY/PEI+NaCl purificado mediante centrifugación (línea azul) y sin purificar (línea roja) en la línea celular H460.	115
Figura 52. Eficiencia de la transfección de pGFP en la línea celular H460 con diferentes sistemas de transfección.	116
Figura 53. Imágenes de microscopía de campo claro y epifluorescencia de células H460 transfectadas con pGFP por diferentes métodos.	117
Figura 54. Micrografía TEM de las nanopartículas Ag@APY y patrón de difracción.	129
Figura 55. Espectro FTIR de APY (línea de puntos gris) y Ag@APY (línea negra sólida).	130
Figura 56. Representación esquemática de la reacción de acoplamiento de anti-EGFR a Ag@APY, mediada por carbodiimida.	131
Figura 57. Espectro de UV-Vis de Ag@APY y Ag@APY-aEGFR.	132
Figura 58. Ensayo de viabilidad AlamarBlue [®] de Ag@APY con diferentes recubrimientos (BSA y PEG) sobre la línea celular A431 transcurridas 48 h.	134
Figura 59. Expresión relativa del receptor EGF en diferentes líneas celulares.	135
Figura 60. Ensayo de viabilidad AlamarBlue [®] de Ag@APY y Ag@APY-aEGFR sobre las líneas celulares A431, HDF, MCF7 y MDA-MB-231 transcurridas 48 h del inicio de la exposición.	137
Figura 61. Ensayo de viabilidad AlamarBlue [®] de Ag@APY-aEGFR sobre las líneas celulares A431, HDF, MCF7 y MDA-MB-231 transcurridas 48 h del inicio de la exposición.	139
Figura 62. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el efecto de la exposición a Ag@APY-aEGFR (10 µg/mL) en la línea celular A431.	140
Figura 63. Ratona BALB/c con tumor inducido en la mama inferior izquierda cinco semanas después de la inoculación de las células 4T1.	141
Figura 64. Imágenes histológicas (H&E) de los tumores crecidos en la glándula mamaria.	142
Figura 65. Imágenes representativas del estudio inmunohistoquímico.	143
Figura 66. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@APY medida usando el ensayo AlamarBlue [®] en la línea celular 4T1, transcurridas 72 h tras la exposición.	144
Figura 67. Peso promedio de las ratonas durante el experimento en función del grupo de estudio.	145
Figura 68. Curva de crecimiento tumoral de los diferentes grupos.	146
Figura 69. Peso de los diferentes tumores explantados tras el tratamiento con Ag@APY.	146
Figura 70. Imagen de TEM demostrando la presencia de Ag@APY en uno de los tumores extirpado.	147
Figura 71. Estructura química del ácido tánico (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆).	155
Figura 72. Mecanismo de reacción de la reducción del TA en la síntesis de nanopartículas metálicas.	157
Figura 73. Síntesis de las diferentes Ag@NPs y TA.	162
Figura 74. Espectros de UV-Vis de las AgNPs y TA.	163
Figura 75. Comparación entre los espectros FTIR de Ag@TA y TA.	166
Figura 76. Espectros de absorción de Ag@TA resuspendida en agua a diferentes valores de pH.	167
Figura 77. Imagen de la suspensión coloidal de Ag@TA a diferentes valores de pH (2-10) transcurridas 24 horas de la síntesis.	168
Figura 78. Ensayo de estabilidad en medio biológico de Ag@TA. Espectros de UV-Vis del sistema Ag@TA en agua Milli-Q y en medio de cultivo suplementado.	169

Figura 79. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células A431.	170
Figura 80. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células HDF.	171
Figura 81. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células 4T1.	172
Figura 82. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA en las células A431, HDF y 4T1.	173

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje atómico de Ag y S en los puntos representativos seleccionados.	74
Tabla 2. Ligando (L) y fracción de recubrimiento (FR) de las nanopartículas Ag@NH ₂ frente a las nanopartículas Ag@tiopronina. ¹⁴⁸	75
Tabla 3. Valores de ζ , diámetro hidrodinámico, conductividad e índice de polidispersión (PDI) de Au@APY en agua Milli-Q y tampón MES 50 mM.	99
Tabla 4. Principales métodos de síntesis de nanopartículas plasmónicas funcionalizadas con TA.	158
Tabla 5. Principales condiciones de síntesis para la obtención de nanopartículas de plata y TA usadas en este capítulo.	161
Tabla 6. Valores de ζ y tamaño hidrodinámico de las diferentes síntesis llevadas en agua Milli-Q. Comparativa de tamaño hidrodinámico (HD) de Ag@BH+TA, Ag@TA+BH y Ag@TA estimado por DLS.	164
Tabla 7. Valores de DL ₅₀ para Ag@TA en las líneas celulares A431, HDF y 4T1 transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición a las nanopartículas.	173

Abreviaturas y acrónimos

4T1	Línea celular de cáncer de mama (murino)
A431	Línea celular de carcinoma epidermoide (humano)
APY	4,6-diamino-2-mercaptopirimidina hidrato
Ag@NH₂	Nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina
Ag@APY	Nanopartículas de plata funcionalizadas con APY
Ag@TA	Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido tánico
AgNPs	Nanopartículas de plata
AuNPs	Nanopartículas de oro
Au@APY	Nanopartículas de oro funcionalizadas con APY
BSA	Albúmina de suero bovino
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	N,N-Dimetilformamida
DL₅₀	Dosis Letal 50
DLS	Dispersión dinámica de luz
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDX	Dispersión de energía de rayos-X
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster
FTIR	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPR	Efecto del Aumento de Permeabilidad y Retención
H460	Línea celular de cáncer de pulmón (humano)
HAADF	Imagen de campo oscuro anular
HD	Distribución de tamaño hidrodinámico
HDF	Línea celular de fibroblasto dérmico (humano)
Hela	Línea celular de cáncer de cérvix (humano)
HepG2	Línea celular de cáncer de hígado (humano)
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
MCF7	Línea celular de cáncer de mama (humano)
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama (humano)
PBS	Tampón fosfatos salino
PEG	Polietilenglicol
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
LSPR	Resonancia del plasmón de superficie localizado

MEF	Fluorescencia amplificada por metal
MES	Ácido 2 morfolinoetanolsulfónico
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaBH₄	Borohidruro sódico
NIR	Región espectral del infrarrojo cercano
NTs	Nanotransportadores
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
NSET	Transferencia de energía en superficie de nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEI	Polietilenimina
pGFP	Plásmido de la proteína fluorescente verde
PPTT	Terapia fototermal plasmónica
PVP	Polivinilpirrolidona. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)
RES	Sistema Retículo Endotelial
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
SERS	Espectroscopía Raman amplificada en superficie
SEIRAS	Espectroscopía de absorción de infrarrojo amplificada en superficie
TA	Ácido tánico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TK	Tirosina quinasa
USFDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
UV-Vis	Espectroscopía de Ultravioleta-visible

Resumen

Las nanopartículas plasmónicas han cobrado especial interés biomédico en los últimos años gracias a las propiedades ópticas asociadas al característico plasmón de superficie, así como a su capacidad de unir moléculas de interés terapéutico en superficie. La combinación diagnóstica y terapéutica en un mismo sistema, es decir, teragnóstica, ha sido abordada desde diferentes enfoques en esta tesis con el objeto de desarrollar herramientas frente a la problemática que representa en la actualidad el tratamiento oncológico.

La presente memoria se divide en varios capítulos. El capítulo introductorio describe la relevancia de las nanopartículas plasmónicas en el contexto de la biomedicina, resaltando sus propiedades y utilidad como herramientas versátiles en la terapia del cáncer. El segundo capítulo detalla el método general de síntesis *in situ* desarrollado en esta tesis de nanopartículas plasmónicas altamente funcionalizadas en superficie. En el tercer y cuarto capítulo se implementan, siguiendo la metodología desarrollada en el capítulo segundo, nanopartículas de oro y plata funcionalizadas con un derivado aminotiolado de pirimidina. Ambas nanoestructuras se estudiarán como agente teragnóstico y vehículo de drogas dirigido a EGFR, determinando su toxicidad selectiva en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su capacidad como agente de transfección génica. Por último, el quinto capítulo recoge el abordaje de nanopartículas plasmónicas funcionalizadas con ácido tánico en el tratamiento selectivo de tumores con sobreexpresión de EGFR.

Capítulo 0
Introducción
*Nanopartículas plasmónicas en
biomedicina oncológica*

Nanotecnología, nanomedicina y terapéutica

El contexto farmacéutico actual se enfrenta a grandes retos debido al auge de las ciencias ómicas,¹ la inclusión de medicamentos biotecnológicos² y la búsqueda de biomarcadores para anticipar el diagnóstico y/o prevenir la progresión de la enfermedad.³ Por todo ello, se vuelve imprescindible el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas que permitan vectorizar activos a entornos donde por su propia naturaleza serían incapaces de acceder, evitar los efectos adversos de su actividad en tejidos inespecíficos, así como rastrear los indicios de enfermedad asegurando el seguimiento de su terapia.

La nanotecnología, y en concreto la nanomedicina, se presenta como un conjunto de herramientas nanométricas con las que se pretende salvar los obstáculos de estos nuevos procedimientos, así como mejorar la eficacia de los tratamientos clásicos basados en la química terapéutica.⁴

Nanotecnología

Desde una óptica más bien literaria, se podría asumir que el concepto de nanotecnología nace un 29 de Diciembre de 1959 en el Instituto Californiano de Tecnología (CalTech) a raíz de un discurso titulado *"There's Plenty of Room at the Bottom"*.⁵ En una reunión de la Sociedad Americana de Física, Richard Feynman, conocido como padre de la nanotecnología, disertaba sobre las posibilidades de la nanoescala mucho antes de que ésta fuera instrumentalmente posible a los niveles que entendemos hoy. Sin embargo, no fue hasta 1981 con el desarrollo de la microscopía de efecto túnel de manos del profesor Norio Taniguchi, y con ello la posibilidad de ver los átomos de forma individual, que no nace lo que se conoce como Nanotecnología Moderna.⁶

A pesar de estos hitos relativamente recientes, ya en 1857 se describía la síntesis de los primeros soles de oro de manos de Michael Faraday.⁷ No obstante, si queremos hablar del verdadero origen de la nanotecnología deberíamos remontarnos unos 1700 años, al siglo IV después de Cristo, con la copa de Licurgo. Este cáliz, que actualmente se expone en el Museo Británico, relata la leyenda del rey Licurgo y la victoria de Dionisio sobre éste. Esta copa tiene propiedades dicróicas, es decir,

presenta diferente coloración según la dirección o posición en que se la mire, reflejando la luz verde y transmitiendo la luz roja. Su secreto: sosa-cal-sílica, 0,5% de manganeso, trazas de otros elementos como antimonio, aproximadamente 40 ppm de oro y 300 ppm de plata. Bajo microscopía electrónica de transmisión se descubrió la presencia de nanopartículas metálicas de oro y plata de entre 50 y 100 nm, responsables de su extraordinario comportamiento.⁸ Sorprendentemente, los artesanos llevaron a cabo esta majestuosa obra de manera empírica, desconociendo la verdadera razón escondida tras su bella respuesta a la luz.



Figura 1. Copa de Licurgo bajo luz reflejada (izquierda) y luz transmitida (derecha).

La Nanociencia es el estudio de la materia en la nanoescala, es decir, cuando al menos una de sus dimensiones es inferior a una micra, y más en concreto, en la mayoría de las aplicaciones biomédicas, se encuentra entre 1 y 100 nm (Fig. 2). La Nanotecnología surge como aplicación de los hitos alcanzados por la Nanociencia en el desarrollo y uso de las entidades extremadamente pequeñas a través del campo de las otras ciencias como son la química, biología, física, ciencia de los materiales y/o la ingeniería.

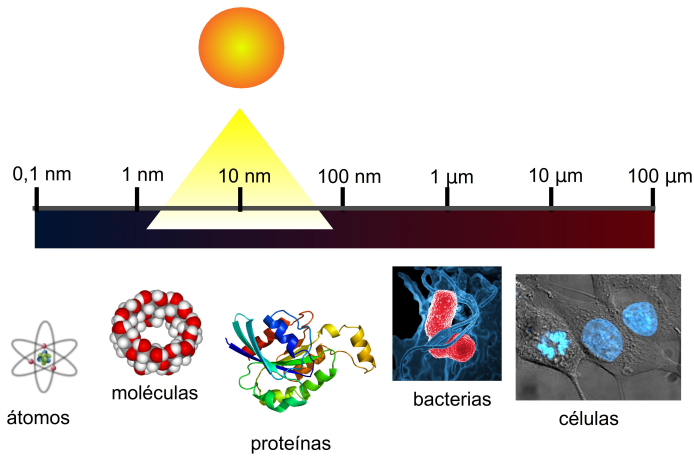


Figura 2. Relaciones de tamaño en la nanoescala.

El estudio minucioso y los avances en esta área, eminentemente interdisciplinar, han dado como resultado infinidad de aplicaciones en campos tan dispares como la medicina,^{9,10} electrónica,¹¹ depuración de aguas,¹² construcción¹³ o incluso en la industria textil.¹⁴

El interés que suscita la nanotecnología en el desarrollo de nuevos materiales se relaciona con lo que se conoce como “efecto de superficie o efecto del tamaño”. A medida que disminuye el tamaño de un material la relación área superficial comparada con su volumen aumenta, es decir, se incrementa el área superficial relativa (Fig. 3).

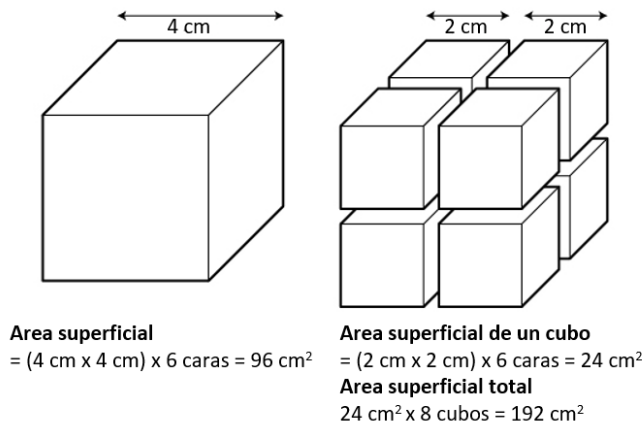


Figura 3. Efecto de superficie o efecto del tamaño. La disminución del tamaño de un material incrementa drásticamente el área superficial relativa.

La consecuencia directa de este efecto es el incremento drástico del número de átomos en superficie. A su vez, los movimientos de los electrones de estos átomos quedan obstaculizados al estar sometidos a un confinamiento cuántico en una determinada dirección. Como consecuencia del confinamiento electrónico los nanomateriales manifiestan propiedades ópticas, electrónicas, y electromagnéticas, diferentes a las de partículas de mayor tamaño del mismo material.¹⁵

Nanomedicina

El concepto de nanomedicina surge de la aplicación de los hitos de la nanotecnología en el campo de la salud. Se trata de una disciplina altamente multidisciplinar que aúna los conocimientos aplicados de las ciencias físicas, químicas y biológicas. Su uso está extendido en diferentes áreas como diagnóstico médico, biosensores, direccionamiento activo de fármacos o incluso la microingeniería tisular, lo que ha propiciado un crecimiento exponencial de esta disciplina en la última década.¹⁶

Áreas de aplicación de la Nanomedicina

En un campo tan extenso como es el de la nanotecnología y ciñéndonos al interés de la nanomedicina, podríamos desglosar esta última en función del área de aplicación principal a la que va dirigida, siendo entonces necesario definir los conceptos nanoterapia, nanodiagnóstico y nanomedicina regenerativa. Si bien esta clasificación no debe ser entendida como un compartimento estanco, pues los sistemas nanoestructurados suelen caracterizarse por ser sistemas multiplataforma, ejerciendo funciones simultáneas como puedan ser dirigir un agente terapéutico hasta el lugar de acción a la vez que facilitar el seguimiento diagnóstico de la patología a tratar.

- Nanoterapia

La nanoterapia se ocupa del desarrollo de nanosistemas capaces de proteger, vehicular y liberar sustancias activas hasta un órgano o tejido diana, con el fin de mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento a la par que disminuir los efectos adversos asociados al mismo.¹⁷

Para llevar a cabo este propósito, los nanosistemas deben presentar un tamaño reducido, de entre pocos nanómetros hasta varios cientos de nanómetros. No obstante, existen autores que extienden este rango de trabajo a todo sistema por debajo del micrómetro. Este pequeño tamaño es necesario para conseguir el tráfico entre los tejidos, facilitando el tránsito de la nanoestructura hasta alcanzar su lugar de acción.¹⁸ A su vez, estos sistemas presentarán características particulares en función de las técnicas de síntesis empleadas, así como de los materiales que los constituyen, como puedan ser lípidos, proteínas, polímeros, dendrímeros, nanotubos, metales nobles o incluso cápsidas de virus, entre otros.

Las propiedades físico-químicas de los activos terapéuticos actúan en multitud de ocasiones en detrimento de su actividad, como es el caso, por ejemplo, de las moléculas hidrofóbicas que presentan claramente disminuida su capacidad de circulación por el sistema circulatorio, o moléculas hidrófilas que ven mermada su capacidad para extravasar tejidos y circular entre membranas lipídicas hasta alcanzar su tejido de acción.¹⁹ Un nanosistema ideal es capaz de corregir esta disfunción del activo terapéutico al protegerlo de las barreras biológicas y de los sistemas de degradación del organismo, incrementando, así, su estabilidad. Así mismo,

al aumentar el tiempo de retención en el compartimento primario, es decir, en el torrente sanguíneo, se favorece la acumulación pasiva en el órgano diana. Estos factores resultan en el aumento de la eficiencia de la sustancia terapéutica.²⁰

Uno de los aspectos más notorios de los nanosistemas de transporte, es la capacidad de anclar en su superficie elementos de reconocimiento, los cuales, como en el caso de los anticuerpos u otras moléculas de reconocimiento, permiten el direccionamiento activo de los agentes terapéuticos.²¹ Esta capacidad mejora significativamente la actividad específica del tratamiento, al aumentar considerablemente la presencia del activo terapéutico en el tejido u órgano diana. Incrementar la presencia en el tejido de interés tiene otro efecto claro, y es que, al impedir la presencia de moléculas activas en órganos inespecíficos se protege en gran medida al organismo de los posibles efectos tóxicos que su actividad inespecífica pueda provocar, disminuyendo así la aparición de efectos secundarios.

■ Nanodiagnóstico

El objetivo del nanodiagnóstico es el diseño de sistemas de detección y/o de agentes de rastreo que permitan la detección rápida, el pronóstico y seguimiento de una patología, así como, la evaluación del tratamiento proporcionando mayor sensibilidad y menor invasividad que las técnicas diagnósticas tradicionales.²²

El nanodiagnóstico puede desarrollarse tanto en *in vivo* como *in vitro*, en función de si se lleva a cabo en el interior del organismo, o bien, con muestras biológicas extraídas del paciente, respectivamente. En este segundo caso, se persigue agilizar los tiempos de obtención de resultados y abaratar el coste técnico.²³ Para ello, se han desarrollado kits colorimétricos, fluorimétricos o espectrofotométricos que permiten detectar la presencia de biomarcadores en exudados o muestras serológicas, principalmente.

En el nanodiagnóstico *in vivo* el nanosistema recorre parte o la totalidad del organismo, interaccionando o acumulándose en el tejido diana. Suele ir asociado a técnicas de imagen como MRI (resonancia magnética de imagen, de sus siglas en inglés) o la tomografía óptica,²⁴ aumentando la capacidad de contraste de la técnica o aportando nuevos

datos cuantificables a esta. Una vez alcanzada la diana, el nanosistema actúa como sonda, emitiendo una señal amplificada y cuantificable. La vectorización del agente de contraste con sistemas de reconocimiento específicos de la diana a marcar mejora la especificidad de la técnica de imagen empleada.²²

- Teragnóstica

La conjunción en un mismo nanosistema multifuncional de un agente terapéutico y un sistema diagnóstico recibe el nombre de agente teragnóstico. La teragnosis es, sin duda, el campo más relevante en el diseño actual de nanopartículas con aplicaciones clínicas, debido a que permite el rastreo, seguimiento y valoración de la actividad terapéutica sin necesidad de realizar técnicas invasivas, como las biopsias, siendo, a su vez, muy sensibles, específicas y particularmente rápidas (Fig. 4).²⁵

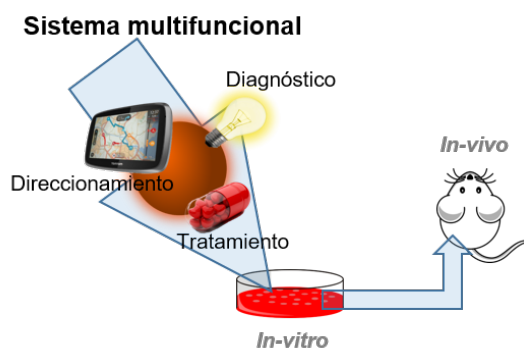


Figura 4. Esquema de sistema teragnóstico basado en nanopartículas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

- Nanomedicina regenerativa

La nanomedicina regenerativa es, quizás, la más reciente aplicación de la nanomedicina, y está adquiriendo un gran interés asociado a la producción de tejidos. La nanomedicina regenerativa desarrolla “andamios nanoestructurados” que permiten el crecimiento de tejidos y la regeneración de órganos mediante ingeniería tisular.²⁶

Nanotransportadores en Nanomedicina

Atendiendo a la composición y naturaleza físico-química que presenten los nanotransportadores, estos exhiben propiedades particulares que los convierten en excelentes candidatos en diferentes escenarios. A grandes rasgos, se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos. Dentro de los orgánicos se encuentran los nanotransportadores lipídicos (liposomas y exosomas),²⁷ poliméricos²⁸ (micelas, nanocápsulas, nanogeles y dendrímeros), víricos y nanoestructuras organometálicas.²⁹ Dentro de los nanotransportadores inorgánicos podemos incluir las nanopartículas magnéticas, *Quantum Dots* (QDs), nanopartículas plasmónicas (de oro y plata, principalmente), así como las nanopartículas de sílica y los nanotubos de carbono.³⁰ Sin embargo, esta posible clasificación general, basada en el elemento principal que compone el nanosistema, atiende a excepciones, pues son numerosas las combinaciones en un mismo elemento de sistemas híbridos que enriquecen, aún más si cabe, las posibilidades a la hora de diseñar nanotransportadores.

Una manera más práctica de clasificar los nanotransportadores es por generaciones, en función de los retos conseguidos en el desarrollo de la técnica (Fig. 5).³¹ Los primeros sistemas nanotransportadores pretendían, principalmente, facilitar el transporte de sustancias que por sus propiedades físico-químicas, como escasa o nula solubilidad, tenían impedida su circulación en el organismo. Así, se han nanoencapsulado fármacos insolubles en agua, como es el caso de muchos antitumorales, para facilitar su circulación y acúmulo en tejidos. No obstante, esta primera generación de nanotransportadores carecía de sistemas de direccionamiento hacia el tejido diana, eran eliminados rápidamente por el sistema inmune y carecían de estabilidad suficiente en ambiente biológico (Fig. 5).

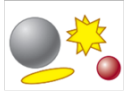
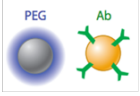
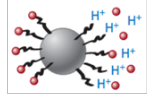
	1ª generación	2ª generación	3ª generación
			
Nanomaterial	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño del material • Solubilidad en agua • Biocompatibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Maximizar la liberación • Evasión del sistema inmune • Direccionamiento activo 	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta al ambiente • Propiedades dinámicas • Activación biológica o externa • Propiedades teragnósticas
Retos biológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Inestable • Eliminados por el MPS • Pobre direccionamiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Sobredependencia del sistema EPR • No existen antígenos universales • Fallos en el direccionamiento activo < 10% en tumores 	<ul style="list-style-type: none"> • A falta de determinar

Figura 5. Clasificación de los nanotransportadores por generaciones en función de los retos conseguidos. MPS, sistema fagocítico mononuclear (de sus siglas en inglés). Adaptado de Albanese et al., 2012.

En la segunda generación, los problemas de estabilidad se resolvieron con el uso de polímeros de recubrimiento biocompatibles, tales como el polietilenglicol (PEG).³² Estos polímeros no solo mejoraban la estabilidad del nanotransportador sino que permitían un mejor control en la cinética de liberación del principio activo transportado, así como la evasión del sistema inmune. Otro hito fundamental en esta segunda generación de nanotransportadores fue el direccionamiento activo de los nanosistemas mediante el uso de anticuerpos de reconocimiento.

La optimización del direccionamiento y la aparición de nuevas funcionalidades en los nanosistemas dan lugar a la tercera generación. En esta última generación, los nanotransportadores son capaces de responder a factores ambientales propios del lugar de acción, contando a su vez con elementos de rastreo que permiten el diagnóstico y seguimiento de una patología determinada a través de técnicas de imagen.

■ Características del nanotransportador ideal

Independientemente de la función a realizar, ya sea terapéutica, diagnóstica o regenerativa, los nanotransportadores deben presentar una serie de características para su uso en la práctica clínica. En este sentido, es fundamental que estos sean seguros, un vehículo farmacológicamente eficiente, biocompatibles y biodegradables. A su vez, a la hora de diseñar un nanotransportador es igualmente necesario que cumpla con los siguientes requisitos.³³

- Alta capacidad de carga de la sustancia activa con objeto de que esta alcance el tejido diana en dosis terapéutica y, eventualmente, conseguir una liberación sostenida en el tiempo.
- Prevenir el efecto de liberación incontrolada antes de la llegada al tejido diana para evitar el daño en tejidos sanos.
- Ser inerte al activo transportado, protegiéndolo de los efectos de degradación y metabolismo.
- Ser capaz de dirigir la sustancia activa al lugar de acción.

Nanopartículas plasmónicas, propiedades y aplicaciones en nanomedicina

Con el término de nanopartículas plasmónicas se hace referencia a las nanopartículas constituidas por metales nobles en su estado fundamental. En la inmensa mayoría de los casos, especialmente para aplicaciones biomédicas, el metal noble usado es oro, plata o una mezcla de ambos. El creciente interés de las nanopartículas plasmónicas en el ámbito de la salud se debe, por un lado, a su capacidad de conjugar en superficie moléculas de interés biomédico y, por otro, a las excepcionales propiedades ópticas que presentan. La característica respuesta a la luz que exhiben este tipo de nanopartículas es consecuencia directa de su “plasmón de superficie”, siendo este el responsable de su nombre.

Propiedades ópticas de las nanopartículas plasmónicas

La interacción del campo electromagnético oscilante de la luz con las nanopartículas plasmónicas da lugar a la oscilación coherente y colectiva de los electrones de conducción respecto al núcleo catiónico de las nanopartículas. A este fenómeno se le denomina “plasmón de superficie” (Fig. 6).

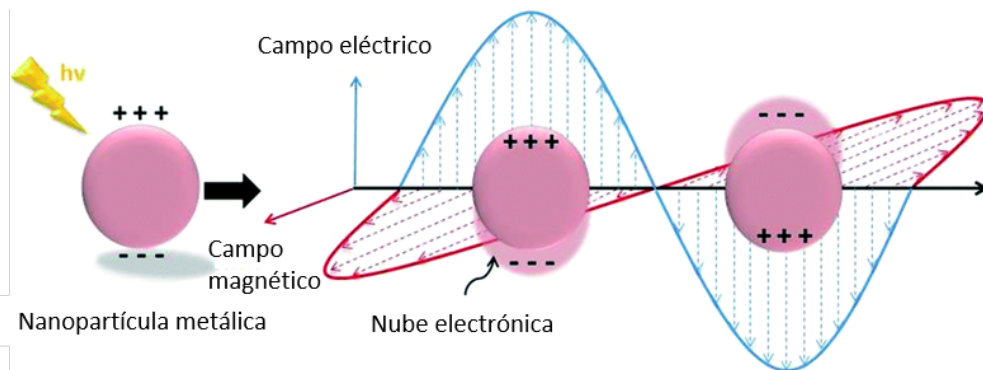


Figura 6. Comportamiento electromagnético de las nanopartículas plasmónicas.

El proceso es resonante a una frecuencia particular en el espectro visible, que se conoce como Resonancia del Plasmón de Superficie Localizado (LSPR, de sus siglas en inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*), y es responsable de la fuerte banda de extinción presentada por las nanopartículas plasmónicas. Por ejemplo, las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan su condición de resonancia del plasmón en las frecuencias de la luz visible, aproximadamente a 520 nm, dando lugar a su característico color rojo tinto.³⁴

Además de los altos coeficientes de extinción molar y dispersión resonante, el LSPR también da lugar a la amplificación de los campos electromagnéticos cerca de la superficie de la nanopartícula.³⁵ Esta respuesta frente a la interacción con la luz capacita a las nanopartículas plasmónicas para la terapia antitumoral por hipertermia, y como agentes de contraste, no sólo en el diagnóstico sino también en el seguimiento de la enfermedad.^{30,36,37}

Resonancia de plasmón de superficie localizado

La teoría de Mie describe que la frecuencia exacta de absorción del LSPR depende tanto de la nanopartícula *per sé* como del medio dispersante. Dos consecuencias importantes surgen de esta dependencia, por un lado el LSPR es sintonizable, es decir, su frecuencia puede ser modificada a través de cambios en la composición de la nanopartícula, en el tamaño o en su forma.³⁸ Por otro lado, las nanopartículas del metal son sensibles a su

entorno local, es decir, a los cambios en las propiedades dieléctricas, que generan un desplazamiento del LSPR que se puede medir. Tanto el desplazamiento como la sensibilidad del LSPR convierten a las nanopartículas metálicas en materiales de elección tanto en la mejora de técnicas de detección óptica como en aplicaciones de imagen.³⁹ Así, la interacción con la luz de las nanopartículas plasmónicas y su capacidad de amplificar señales electromagnéticas ha dado lugar al desarrollo de diferentes técnicas espectroscópicas y de imagen que desarrollaremos brevemente a continuación:

- Métodos basados en la medida del espectro de UV-Vis

La frecuencia máxima de absorción plasmónica es fuertemente dependiente tanto de las moléculas adsorbidas en superficie como del acoplamiento electromagnético entre los plasmones de resonancia de distintas nanopartículas, cuando estas están muy próximas entre sí. Dado que el plasmón de superficie de las nanopartículas de oro y plata se encuentra en el espectro visible, se pueden detectar fácilmente pequeños cambios en el estado de agregación por espectroscopía UV-Vis. Estos cambios consisten en un desplazamiento del máximo de absorción a mayores longitudes de onda, lo que, por ejemplo en el caso de las AuNPs esféricas, resulta en cambios visibles del color de la suspensión que vira de rojo a azul. Este fenómeno en respuesta a la presencia de ciertos analitos en disolución ha dado lugar al desarrollo de métodos basados en nanopartículas plasmónicas como sensores colorimétricos.⁴⁰

- Espectroscopía Raman aumentada en superficie

La espectroscopía Raman es una técnica muy específica usada para detectar e identificar moléculas en función de los niveles de energía vibracional. Estos niveles son únicos para cada especie química constituyéndose como una “huella dactilar”.^{41,42} En la dispersión Raman, los fotones son dispersados de forma inelástica, ya sea perdiendo energía (desplazamiento *Stokes*) o ganando energía (desplazamiento *anti-stokes*), igual a la vibración molecular de la especie estudiada. Uno de los retos a los que se enfrenta la espectroscopía Raman es la detección de pequeñas cantidades de moléculas. La baja eficiencia de la dispersión Raman de una molécula generalmente resulta en señales débiles en Raman para bajas concentraciones. Con la Espectroscopía Raman Aumentada en superficie (SERS, de sus siglas en inglés Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) se

amplifican las señales Raman de las moléculas cercanas a la superficie de la nanopartícula metálica, produciendo un inusitado aumento en la sensibilidad que permite llegar a detectar incluso una única molécula en una muestra, gracias al aumento del campo electromagnético debido al LSPR.⁴³⁻⁴⁵

- Espectroscopía infrarroja aumentada en superficie

En la Espectroscopía Infrarroja Aumentada en Superficie (SEIRAS, de sus siglas en inglés *Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*) se pueden atribuir, de manera general, mecanismos similares al efecto SERS, siendo estas técnicas complementarias. No obstante, la principal diferencia entre ambos fenómenos es que SERS ocurre cuando hay un cambio en la polarizabilidad de la molécula cerca de la superficie del nanosistema, mientras que en SEIRAS es necesario un cambio en el momento dipolar perpendicular a la superficie del sustrato.⁴⁶ La gran sensibilidad de esta técnica permite analizar tanto de forma cualitativa como cuantitativa trazas de especies químicas en el rango de picogramos a miligramos. Su uso está extendido en detección química y bioquímica así como en monitorización de aguas residuales o en inmunoensayo.⁴⁷ No obstante, una clara desventaja de SEIRAS frente a SERS es que la primera no se puede utilizar en muestras acuosas (como es el caso de la mayoría de las muestras biológicas), ya que el agua absorbe en el infrarrojo interfiriendo, por tanto, con el registro de otros componentes de la muestra.

- Fluorescencia aumentada por metal

Los marcadores fluorescentes, pese a presentar una baja relación señal/ruido y un marcado *fotobleaching*, son ampliamente usados en ensayos bioquímicos. Una estrategia para resolver estos inconvenientes es el uso de nanopartículas metálicas en lo que se conoce como Fluorescencia Aumentada por Metal (MEF, de sus siglas en inglés *Metal-Enhanced Fluorescence*).⁴⁸

El efecto MEF es dependiente de la distancia entre el fluoróforo y la superficie del metal. A distancias muy pequeñas (1-3 nm) la fluorescencia se *quenchea* por procesos de transferencia de electrones. Sin embargo, si el fluoróforo se encuentra a una distancia de entre 4-10 nm de la superficie del metal su emisión aumenta considerablemente. Este aumento en la señal se atribuye al campo electromagnético local cerca de la superficie de

la nanoestructura y lleva a un aumento de la vida media del fluoróforo.⁴⁹ Dos de los campos donde más se ha desarrollado esta técnica son el inmunoensayo y la detección de nucleótidos.

- Transferencia de energía en superficie de nanopartículas

Muchas aplicaciones biológicas, en especial aquellas basadas en interacción de proteínas y/o actividad enzimática se basan en la Transferencia de Energía de Resonancia Föster (FRET, por sus siglas en inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Este efecto se da en fluoróforos separados a menos de 10 nm. Debido a esta pequeña distancia la energía puede pasar de un fluoróforo (donador) a otro fluoróforo (aceptor) gracias a procesos no radiativos.⁵⁰

Esta transferencia de energía resulta en un incremento en la emisión de fluorescencia del aceptor y en un descenso de la fluorescencia de la especie donadora. La pequeña distancia de separación (<10 nm) requerida para que ocurra la transferencia de energía es el mayor inconveniente del FRET. Con el objeto de superar esta limitación, se han logrado emplear nanoestructuras que actúan como aceptores. La energía de transferencia resultante se denomina Transferencia de Energía en Superficie de Nanopartículas (NSET, de sus siglas en inglés *Nanoparticles Surface Energy Transfer*) y puede incrementar la distancia de Föster por un factor de ~2.⁴⁸

- Terapia fototermal plasmónica

En la Terapia Fototermal Plasmónica (PPTT, de sus siglas en inglés *Plasmonic Photo-Thermal Therapy*) las nanopartículas plasmónicas absorben luz cuando esta incide a la frecuencia de resonancia de su plasmón superficial. La energía absorbida decae mediante procesos radiativos como la dispersión, si bien estos niveles de energía también pueden decaer por procesos no radiativos emitiendo calor y disipándose esta en el medio circundante. Modulando el tamaño y la forma de la nanopartícula plasmónica durante el proceso de síntesis se puede conseguir que su LSPR se encuentre en las longitudes de onda del infrarrojo cercano, permitiéndoles absorber y convertir esta energía en calor, alcanzando temperaturas de hipertermia. Este fenómeno se conoce como “efecto fototérmico”.⁵¹

El calor generado por el efecto fototérmico se puede emplear directamente para eliminar de las células cancerígenas, liberar agentes

activos transportados o incluso aplicaciones de detección del tumor mediante técnicas de imagen fototérmica. En el caso de la terapia por hipertermia, la región en la que se acumulan las nanopartículas, en este caso el tumor, se calienta varios grados por encima de la temperatura fisiológica (40-45°C).⁵² El calor generado provoca cambios en la fisiología de la célula, que incluyen el mal plegamiento de las proteínas y su agregación, alteraciones en las señales de transducción, cambios en el potencial de membrana y una disminución de la perfusión y oxigenación del tumor, llevando finalmente a la célula tumoral a su destrucción por apoptosis.⁵³

Síntesis química de nanopartículas plasmónicas

Las nanoestructuras de oro y plata para aplicaciones biomédicas, se desarrollan, frecuentemente, siguiendo el método de síntesis coloidal dado que, en general, no requieren elevados requerimientos técnicos, son rápidos y versátiles. Por otro lado, al tratarse de un procedimiento en medio acuoso, se facilita la purificación del sistema evitando la presencia de impurezas y restos de disolvente que puedan desencadenar efectos tóxicos. Este acercamiento se basa en un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizador que permita controlar el tamaño, la forma y, en consecuencia, las propiedades ópticas de la nanoestructura resultante.⁴⁸

Las propiedades ópticas del coloide de nanopartículas plasmónicas son una consecuencia directa del tamaño, la forma y la homogeneidad de ambos factores en el seno del coloide. Es por ello fundamental controlar todos los parámetros que afecten a la síntesis de las nanopartículas durante el proceso de nucleación y crecimiento, así como las estrategias que garanticen su estabilidad. En la figura 7 se hace mención a los principales factores que intervienen en esta metodología de síntesis.



Figura 7. Factores que afectan a la síntesis de nanopartículas plasmónicas.

Los agentes reductores llevan los precursores metálicos, es decir, la sal metálica, a su estado fundamental siendo, por tanto, responsables de la nucleación y crecimiento de las nanopartículas. Estos agentes pueden ser rápidos o lentos. Los rápidos, como el borohidruro sódico o el citrato, favorecen la formación de los núcleos sobre el crecimiento de estos, por lo que suelen dar lugar a nanopartículas pequeñas. Por el contrario, los reductores lentos favorecen el proceso de crecimiento sobre el de nucleación, obteniéndose nanopartículas de mayor tamaño.⁵⁴

Los agentes de recubrimiento son generalmente polímeros, como PEG o polivinil pirrolidona (PVP), por ejemplo, que participan en la estabilización posterior del coloide resultante. Los polímeros de recubrimiento pueden ser, además, relevantes para la función biológica, dado que se pueden seleccionar de forma que mejoren las propiedades farmacocinéticas, dificulten el reconocimiento por el organismo y protejan al nanosistema frente a la degradación. A su vez, estos pueden participar en la propia formación de la nanopartícula, actuando como agentes de reducción y/o dirigiendo el crecimiento de la estructura cristalina en función de la reactividad de sus caras.⁵⁵

La temperatura durante el proceso de síntesis afecta a la cinética de nucleación y crecimiento de las nanopartículas.⁵⁶ Así mismo, el pH, la presencia de impurezas, la velocidad de agitación o incluso la necesidad de

llevar a cabo la síntesis en condiciones de atmósfera inerte son factores igualmente relevantes a la hora de producir el coloide de interés.⁵⁷

Funcionalización de nanopartículas plasmónicas

La funcionalización tiene como propósito proporcionar nuevas competencias al nanosistema, ya sea para aumentar la estabilidad del coloide, modificar su respuesta físico-química, influir en su farmacocinética, transportar sustancias activas, incluir marcadores de rastreo o introducir agentes estímulo-respuesta ante determinadas condiciones del medio. La interacción entre el agente funcional y la superficie de la nanopartícula puede ser de tipo fisorción, cuando el agente que se adhiere en superficie mantiene su naturaleza química, o tratarse de un proceso de quimisorción, cuando la molécula adsorbida da lugar a una especie química distinta. Las estrategias más comunes para funcionalizar nanopartículas plasmónicas en biomedicina son la quimisorción, la formación de enlaces tipo amida, tiourea o carbamato, la interacción electrostática y el entrapamiento hidrofóbico (Fig. 8).⁴⁸

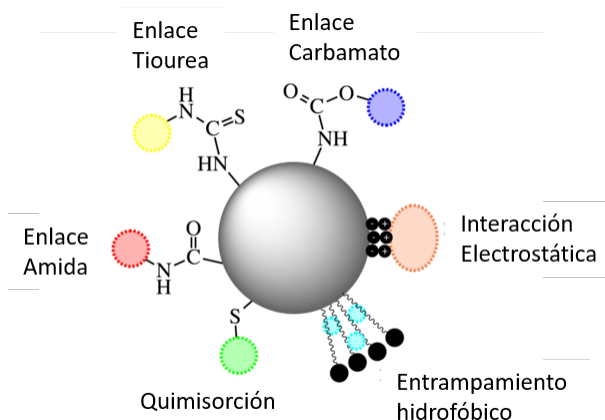


Figura 8. Estrategias más comunes en la funcionalización de nanopartículas plasmónicas para aplicaciones biomédicas.

La funcionalización puede tener lugar por incubación directa o por la formación de enlaces covalentes. Durante la incubación las moléculas

tienden a unirse a la superficie del metal mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, estéricas y/o de puentes de hidrógeno, que favorecen la fisisorción de las especies en superficie. En el caso de las moléculas hidrofóbicas, como puedan ser multitud de activos terapéuticos, éstas tienden a “escondarse” en el seno de la nanopartícula evitando la repulsión del medio acuoso externo, por lo que resulta una excelente estrategia de encapsulación para numerosos agentes terapéuticos. Un caso particular de interacción es la elevada afinidad que presentan los derivados tiolados por la superficie de las nanopartículas metálicas. Esta quimisorción recibe el nombre de enlace “semicovalente” en algunos artículos, y supone una estrategia a seguir en los procesos de funcionalización por su sencillez y la estabilidad de las nanopartículas resultantes.⁵⁸

En numerosas ocasiones se recurre a la unión covalente entre la nanopartícula y el agente orgánico mediante la formación de nuevos enlaces carbamato, tiourea o, tal vez el más representativo, el enlace amida.⁵⁹ La reacción de acoplamiento por carbodiimidias da lugar a enlaces amida, entre grupos funcionales amino y carboxilo, o a enlaces tipo éster, entre ácidos carboxílicos y alcoholes. Este tipo de interacción covalente es de especial interés cuando se pretende funcionalizar nanopartículas con péptidos y/o anticuerpos de reconocimiento, por lo que será ampliamente utilizada a lo largo de esta tesis.

Estabilidad coloidal de las nanopartículas plasmónicas

Es importante resaltar que la actividad del nanosistema depende en gran medida de su estabilidad en el medio dispersante. La tendencia natural de las nanopartículas metálicas no funcionalizadas es la agregación, que puede culminar en un proceso de floculación reversible o de precipitación irreversible.⁶⁰ Existen dos estrategias que permiten estabilizar las nanopartículas, la estabilización estérica y la estabilización electroestática (Fig. 9).

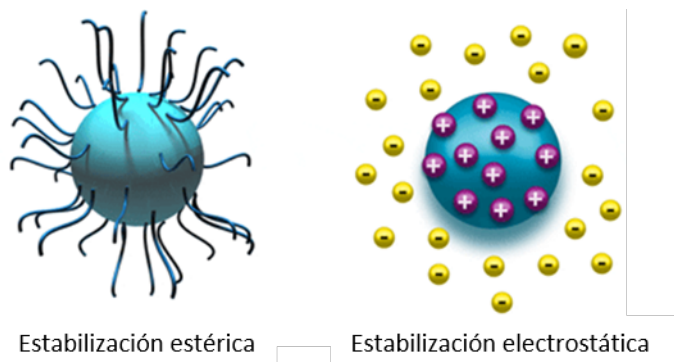


Figura 9. Representación esquemática de los modos de estabilización de nanopartículas. Izquierda, estabilidad por impedimento estérico o estabilización estérica; derecha, estabilidad por repulsión de carga o estabilidad electrostática.

Así, por ejemplo, los polímeros como el PEG o la PVP confieren a la nanopartícula estabilidad al evitar la agregación por impedimento estérico en medio acuoso. Por otro lado, la estabilización electrostática, basada en la repulsión de cargas del mismo signo entre la superficie de nanopartículas adyacentes, puede estar influenciada por el pH del medio así como por la concentración salina del mismo. Ambas estrategias de estabilización, es decir, la estérica y la electrostática, no son excluyentes, siendo dependientes del balance entre las fuerzas electrostáticas atractivas y repulsivas que se producen entre las partículas así como de la presencia de agentes adsorbidos que actúen a modo de impedimento estérico entre estas.⁶¹

El potencial zeta (ζ) y el volumen hidrodinámico son dos valores experimentales que nos permiten estimar la estabilidad coloidal. El ζ , basado en la movilidad electroforética del coloide, cuantifica la carga del nanosistema en su plano de cizalladura (plano de deslizamiento entre la cobertura de agua adherida a la superficie cargada y el seno del coloide). El diámetro hidrodinámico estima el tamaño medio de la nanopartícula contando con la capa de hidratación que es arrastrada por esta en el plano de deslizamiento (Fig. 10).

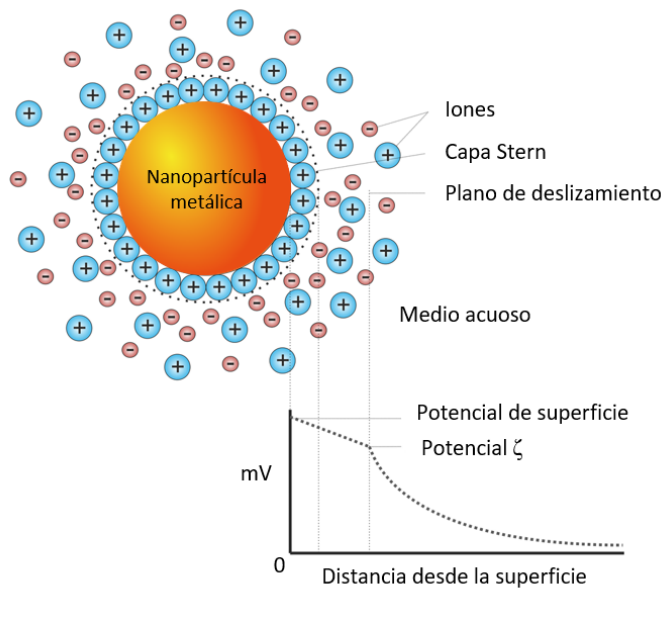


Figura 10. Relación entre la capa de solvatación y el ζ . Diagrama representando la solvatación iónica respecto a la diferencia de potencial en función de la distancia entre la carga superficial y la nanopartícula suspendida en medio acuoso.

Variaciones en la estabilidad coloidal del nanosistema terapéutico desencadenan cambios farmacocinéticos del sistema que afectan a la distribución, la acumulación y la liberación de las sustancias activas.⁶²

Tamaño y grado de hidrofilia de nanopartículas plasmónicas

El tamaño y la hidrofilia juegan un papel fundamental en la respuesta biológica de las nanopartículas, en general, y de las nanopartículas metálicas, en particular. Pequeñas variaciones en estos parámetros pueden desencadenar un comportamiento radicalmente distinto.

El tamaño, como veremos de manera más extensa en las siguientes secciones, está ligado a factores determinantes en la eficacia de las nanopartículas, como son:

- La facilidad para atravesar tejidos fenestrados como, por ejemplo, es el caso del endotelio vascular en los procesos tumorigénicos;

- La evasión del sistema inmune, al impedir el reconocimiento por los macrófagos; y/o
- La interacción con especies biológicas.

El grado de hidrofilia/hidrofobicidad de una especie queda reflejado por su coeficiente de partición octanol/agua, siendo éste un concepto igualmente aplicable a los sistemas coloidales. Modificaciones en el mismo van a influir en la farmacocinética que presente el nanosistema. Una mayor hidrofobicidad facilita el tráfico entre membranas, así como la acumulación en los depósitos grasos de reserva. El aumento en la hidrofilia que otorgan los recubrimientos poliméricos como el PEG disminuye el reconocimiento por macrófagos, a la vez que aumenta la vida media del nanosistema en el torrente sanguíneo mejorando la biodistribución de este.⁶³

Toxicidad de las nanopartículas plasmónicas

En la actualidad las nanopartículas de plata (AgNPs) son las que cuentan con el mayor grado de comercialización dentro de las nanopartículas metálicas debido a su buena conductividad, estabilidad química, actividad catalítica y actividad antibacteriana. Así las AgNPs están presentes en ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, y numerosos productos destinados a aplicaciones biomédicas y en las industrias médico-farmacéutica y alimentaria.

Las propiedades ópticas asociadas al plasmón de superficie de las nanopartículas de oro y plata han propiciado su auge como agentes teragnósticos para aplicaciones biomédicas. Paralelamente a este avance, también se han intensificado los estudios para discernir sus posibles efectos tóxicos. Así, se ha demostrado que no sólo la composición sino el tamaño, forma, área superficial, carga superficial y el estado de agregación de las nanoestructuras juegan un papel relevante en los posibles efectos tóxicos. Estas peculiaridades requieren una evaluación toxicológica individualizada para cada nanosistema desarrollado, así como en función de la aplicación a la que vaya dirigido.

Si bien se desconocen a ciencia cierta los mecanismos que llevan a la toxicidad de las AgNPs, se piensa que éstas juegan un papel similar a un “caballo de Troya”, entrando al interior celular de manera inespecífica

mediante endocitosis. La fusión del endosoma con el lisosoma genera un ambiente ácido que promueve la liberación de iones de plata de la nanopartícula que interactúan con los componentes de la célula generando especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés).⁶⁴ La generación de ROS por la célula ante un factor de estrés ambiental, como la temperatura o patógenos, es un fenómeno bastante común. En el caso de las AgNPs, el gran área superficial reactiva de las nanopartículas ofrece una capacidad masiva de oxidación.

La célula tiene mecanismos de defensa, como el sistema redox glutatión, capaces de “tamponar” cierta cantidad de ROS, desencadenándose efectos tóxicos una vez superados estos. Si bien el nexo entre los niveles de ROS y la inducción de efectos tóxicos aún no se ha esclarecido, se sabe que es dependiente del tipo celular.⁶⁵ En general, pequeños y transitorios aumentos de ROS pueden ser tolerados por la mayoría de tejidos, produciéndose el daño si los niveles permanecen altos de manera continuada. No obstante, es un rasgo generalizado que las células tumorales presenten menor tolerancia al aumento del estrés oxidativo que las células sanas debido, principalmente, a los altos niveles basales que estas presentan. La figura 11 representa, de manera esquemática, diferentes mecanismos de daño, a nivel celular, que pueden ocasionar las nanopartículas metálicas.

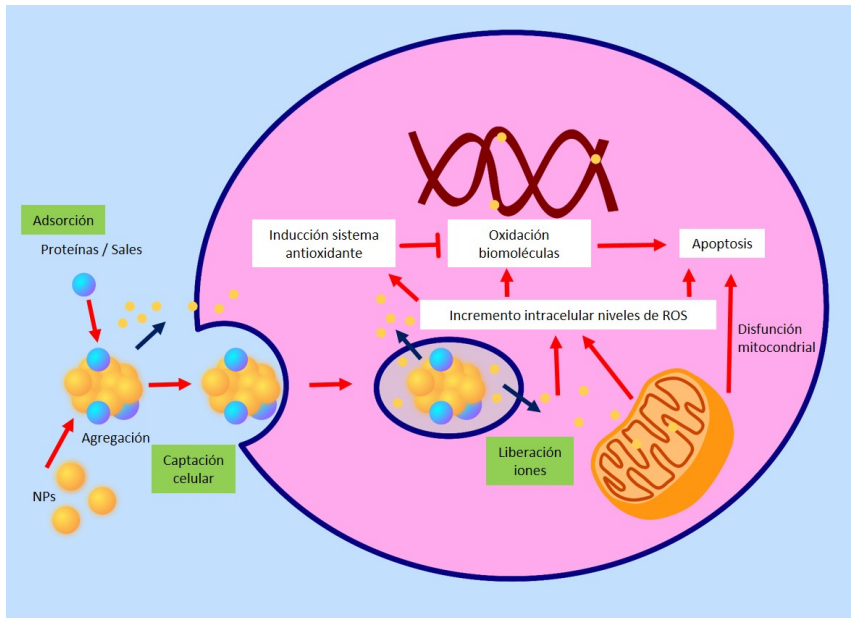


Figura 11. Mecanismos de citotoxicidad promovidos por nanopartículas metálicas. (Adaptado de Horie et al., 2012).

Además de la generación de ROS, tanto las AgNPs como los iones Ag^+ liberados por estas pueden interactuar con organelas como la mitocondria, proteínas como la NADPH oxidasa, diversos receptores, activar rutas de señalización, o incluso entrar en el núcleo e interactuar con el DNA.⁶⁶

En contraposición a lo observado en la plata, el oro se reconoce como un material biocompatible que se considera inerte, por lo que su uso en terapia se acepta en términos generales.⁶⁷ No obstante, determinados elementos de las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden inducir toxicidad, siendo especialmente relevantes el tamaño y la reactividad superficial. Se ha comprobado que las AuNPs de diámetro igual o inferior a los 3 nm generan citotoxicidad. De hecho, las AuNPs de un diámetro en torno a 1,4 nm pueden interactuar con el surco mayor de las hebras de DNA, especialmente si estas presentan carga positiva en superficie, pudiendo interactuar con los fosfatos del material genético.⁶⁸ Por otro lado, algunos investigadores especulan que nanopartículas mayores de 5,5 nm no pueden ser excretadas por el organismo.⁶⁹ Por otra parte, la reactividad

funcional de la superficie de las AuNPs se considera otro factor crítico en sus posibles efectos tóxicos. La elevada superficie específica, así como los diferentes agentes estabilizantes presentes en superficie, pueden incrementar la reactividad superficial interaccionando con biomoléculas, generando ROS, así como acumularse en compartimentos celulares, superándose concentraciones tóxicas a nivel subcelular.⁷⁰

Estos eventos nos llevan a afirmar que, si bien *a priori* las AuNPs pueden usarse en aplicaciones biomédicas, su biocompatibilidad dependerá de numerosos factores, por lo que es necesario evaluar la toxicidad de manera pormenorizada para cada tipo de nanosistema de oro desarrollado.

Nanopartículas plasmónicas en la terapéutica del cáncer

Cáncer

En la actualidad el cáncer figura como uno de los mayores problemas de salud pública, constituyéndose como la segunda causa de mortalidad a nivel mundial. En España, desde el año 2000 el cáncer se sitúa como la primera causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres.⁷¹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) recoge para éste la siguiente definición:

“Término genérico que designa a un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis».”

Desde una perspectiva más molecular, los investigadores D. Hanahan y R. Weinberg han definido una serie de alteraciones a nivel celular por las que se rigen los procesos tumorogénicos, dando lugar a lo que se conoce como *Hallmarks del cáncer*:^{72,73}

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento
- Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento
- Evasión de la muerte celular programada
- Potencial replicativo ilimitado
- Inducción de angiogénesis
- Invasión de tejidos y metástasis
- Metabolismo desregulado

- Evasión del sistema inmune
- Inestabilidad genómica
- Inflamación

En 2012 se registraron más de 14 millones de casos en todo el mundo y se prevé un aumento de la incidencia de un 70 % en los próximos 20 años.

La sociedad Americana del Cáncer recoge que en el año 2016 se diagnosticaron más de 4600 nuevos casos al día en Estados Unidos, estimándose en unos 1600 los decesos al día para el mismo periodo.⁷⁴ Los datos recogidos por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) indican que en 2015 se diagnosticaron casi un cuarto de millón de nuevos casos de los cuales un 60% eran hombres y un 40% mujeres. Los 5 cánceres más comunes fueron el de colon y recto (17%), próstata (13%), pulmón (11%), mama (11%) y vejiga (9%).⁷¹

La nanotecnología, en general, y las nanopartículas plasmónicas, en particular, se presentan como firmes candidatos en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas en la lucha contra el cáncer. Por un lado, éstas nanopartículas pueden actuar como agentes que permiten vehicular drogas de manera dirigida, aumentando la especificidad del tratamiento, y, por ende, disminuir los posibles efectos tóxicos de los agentes citostáticos convencionales. Por otro lado, las propiedades ópticas asociadas al plasmón de superficie posibilitan el rastreo de los nanosistemas facilitando el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del proceso tumoral.

Transporte pasivo de nanopartículas

El direccionamiento pasivo es la estrategia seguida por la mayoría de los nanotransportadores en la práctica clínica, constituyendo la primera generación de nanomedicamentos. El objetivo principal consistía en controlar la farmacocinética y biodistribución del principio activo modulando sus propiedades físico-químicas. Las particulares características fisiopatológicas del tejido tumoral definidas como "*efecto del aumento de permeabilidad y retención*" (EPR, de sus siglas en inglés *Enhanced*

Permeability and Retention) facilitan la acumulación de agentes que presenten ciertas singularidades a nivel físico-químico.

Efecto del aumento de permeabilidad y retención

La permeabilidad aumentada observada en el tejido vascular bajo ciertas patologías, como el cáncer o la inflamación, es resultado de la desregulación de la angiogénesis y/o el aumento y la expresión de factores de permeabilidad vascular. El desequilibrio en expresión y activación de moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas resulta en una capa endotelial discontinua, donde la fenestración entre las células endoteliales puede estar en el rango de 300 - 4700 nm.⁷⁵ A su vez, la compresión de los vasos linfáticos por el crecimiento de células tumorales provoca una linfoangiogénesis disfuncional. Como resultado del insuficiente drenaje linfático, las construcciones presentes en el fluido intersticial del tumor permanecen retenidas mucho más tiempo del que estarían en el tejido normal con vasos linfáticos funcionales.⁷⁶⁻⁷⁹

La explotación del efecto EPR por parte de nanosistemas ha mostrado un consistente aumento de la fracción de agente farmacológico que alcanza el tejido tumoral. Además, la ausencia de grandes fenestraciones en el tejido no patológico previene frente a la extravasación y el depósito de las nanopartículas en tejido sano, reduciendo de este modo los efectos secundarios a nivel sistémico. Las dos excepciones más notables a este efecto son el hígado y el bazo, dado que ambos órganos presentan comúnmente grandes fenestraciones.⁸⁰

El uso del EPR para el transporte de sustancias activas al tejido tumoral está condicionado por una serie de factores limitantes que disminuyen la eficiencia y eficacia del proceso de transporte pasivo:

- Elevada presión del fluido intersticial

La suma de numerosos factores como la fuga de fluidos plasmáticos y proteínas debida a la fenestración, aumento de la presión coloidal consecuencia del aumento en contenido proteico, compresión de los vasos linfáticos por el crecimiento del tumor que impide el drenaje del tejido linfático se produce como resultado un aumento de la presión intersticial que constituye una de las principales barreras para la penetración de agentes terapéuticos.^{81,82}

- Penetración en el tejido

Constituye una barrera significativa en la eficacia del nanosistema. Los tumores suelen presentar una densa matriz extracelular, en torno a los vasos sanguíneos que irrigan el tejido tumoral, con objeto de proporcionar los nutrientes y el oxígeno necesario para la elevada tasa de crecimiento celular. Las nanopartículas tienen que atravesar varios estratos celulares por lo que su actividad suele estar restringida a las células que rodean los vasos sanguíneos.

- Tejido tumoral no vascularizado

Existen variaciones significativas en el grado de vascularización en función del tipo de tumor y de su estadio. En tejidos tumorales donde la densidad de microvasos es baja, la capacidad de vehiculización efectiva del nanosistema se ve reducida de forma significativa debido a que la distancia que la nanoestructura tiene que difundir aumenta considerablemente. Además, la ausencia de una adecuada estructura de capilares previene el adecuado suministro de nutrientes al tejido tumoral, resultando en hipoxia, acidosis y estrés oxidativo. Todos estos efectos dan lugar a una región necrótica.

- Acumulación en hígado y bazo

Hígado y bazo tienen una gran fenestración endotelial (~100 nm y ~5000 nm, respectivamente)^{83,84} facilitándose la extravasación de las nanopartículas a estos tejidos. Sin embargo, la extensión con la cual estos nanosistemas se acumularán en hígado y bazo está determinada por varios parámetros. Así, el tamaño, el recubrimiento o la carga del nanosistema pueden alterar la acumulación de este en varios órganos^{80,85} previniendo el desarrollo de efectos indeseados. No obstante, se ha demostrado que las nanomedicinas pueden acumularse y ser retenidas en tejido tumoral hepático en mayor proporción que en tejido hepático sano, un efecto que puede estar ligado al diferente grado de drenaje linfático entre el tejido sano y el tumoral. Por ello, estos factores deben de ser tenidos en cuenta a la hora de implementar los nanosistemas desarrollados.

Biodistribución y aclaramiento plasmático de las nanopartículas

Al igual que ocurre con el tamaño y la superficie de la nanopartícula, el balance hidrofiliicidad/hidrofobicidad aparente del nanosistema va a influenciar en el transporte de éste a lo largo del organismo. El aumento de la hidrofobicidad tiende al acúmulo del nanosistema en el compartimento periférico, es decir, en músculo, tejido adiposo y hueso. Este hecho debe ser un factor más a tener en cuenta a la hora de evaluar las curvas de niveles plasmáticos y su volumen aparente de distribución. Por el contrario, una mayor hidrofilia va a favorecer que el nanosistema permanezca estable en circulación el tiempo suficiente para que se produzca una mayor acumulación en el tejido tumoral.

A su vez, el sistema inmune compromete macrófagos presentes en hígado, bazo y tejido conectivo para eliminar elementos que considere extraños. Es por ello necesario escapar del sistema reticuloendotelial (RES, de sus siglas en inglés *reticuloendothelial system*) y evitar su rápida eliminación vía sistema renal. Se hace por tanto necesario tener en cuenta estos eventos a la hora de funcionalizar el nanosistema con agentes o elementos que permitan eludir el reconocimiento del mismo. Esta evasión tiene por objeto aumentar el tiempo de vida media en circulación, facilitando la acumulación del nanosistema en el tumor. Las estrategias tradicionales se basan en agentes de recubrimiento hidrofílicos como el PEG, polietilentalcohol, polaxámeros, poliaminoácidos o azúcares. Entre estos, la pegilación sigue siendo la estrategia más consolidada de cara a reducir la absorción de proteínas, proceso conocido como opsonización, y en consecuencia el aclaramiento vía RES.⁸⁶

Direccionamiento activo de fármacos

Hace ya más de 100 años el médico alemán Paul Erlich introdujo el término “bala mágica”, haciendo referencia a la capacidad que presentarían los nanotransportadores para dirigirse a una localización específica. En la actualidad, este concepto se conoce como direccionamiento activo de fármacos.⁸⁷ Para conseguirlo, el nanotransportador se funcionaliza en superficie con moléculas de alto reconocimiento específico para proteínas de superficie en la célula diana. Esta especificidad aumenta en gran medida

el grado de acumulación en el tejido de interés. Para este propósito se han usado un amplio rango de ligandos incluyendo moléculas pequeñas como el ácido fólico o carbohidratos, o bien, macromoléculas como péptidos, oligonucleótidos, aptámeros y anticuerpos.

El ligando debe ser elegido de manera que permita la interacción con la célula diana a la vez que se minimice la unión a células sanas. Para un direccionamiento eficiente los nanotransportadores deben ser lo suficientemente estables para impedir la liberación prematura del agente activo, y con ello evitar su degradación en circulación y/o su actividad inespecífica. Del mismo modo, es vital favorecer una prolongada circulación del medicamento en sangre impidiendo interacciones inespecíficas de este con proteínas del suero, o su reconocimiento por el sistema inmune que en última estancia provocarían un aclaramiento del agente de interés.

Una de las dianas celulares más extendidas en el direccionamiento activo de nanosistemas por anticuerpos es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) al tratarse de un receptor ubicuo que se sobreexpresa en ciertos tejidos tumorales.

Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El EGFR es un receptor de superficie celular perteneciente a la familia de tirosina kinasas ErbB. Entre sus funciones destaca la regulación, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Tanto las alteraciones en su función como la sobreexpresión de EGFR están relacionadas con el crecimiento y la supervivencia de células malignas.⁸⁸

Una de las estrategias más extendida en la práctica clínica oncológica es el uso de anticuerpos monoclonales que interactúan con el dominio de interacción a ligando y, por ende, inhiben la actividad tirosina kinasa del EGFR. Entre los más conocidos se encuentra cetuximab (Erbix[®]), aprobado en 2004 por la USFDA (de sus siglas en inglés, *United States Food and Drug Administration*), un anticuerpo monoclonal quimérico que se administra por infusión intravenosa y está indicado en metástasis colorrectal y en cáncer de cabeza y cuello. Si bien, la inhibición de su actividad constituye en sí misma una diana terapéutica, la aparición de resistencias hace necesario el desarrollo de herramientas conjuntas.

Es reseñable que EGFR es un antígeno de internalización, lo que conlleva a que los sistemas funcionalizados con sistemas de reconocimiento de EGFR se acumulen en el citoplasma o el núcleo en mayor proporción que los sistemas que se direccionen a antígenos que no internalicen.⁸⁹ En esta tesis se ha estudiado ampliamente esta particularidad para el transporte selectivo de nanopartículas a células diana con sobreexpresión de EGFR.

Nanopartículas plasmónicas en la clínica del cáncer

En la actualidad sólo existen seis nanomedicamentos aprobados por la USFDA: brentuximab vedotin, trastuzumab emtansina, Doxil[®], DaunoXome[®], Marqibo[®] y Abraxane[®].⁹⁰ La falta de estandarización en los ensayos preclínicos, así como el estudio, todavía empírico, de los sistemas de liberación, dificulta la aprobación y registro de medicamentos nanotecnológicos.⁹¹ Entre los nanomedicamentos citados ninguno está basado en nanopartículas plasmónicas. No obstante, el potencial terapéutico y la versatilidad de las mismas las convierten en buenos candidatos para su uso y evaluación clínica, siendo el área oncológica donde cobran especial interés sus excepcionales propiedades. En este sentido, se han desarrollado estrategias terapéuticas basadas en nanopartículas plasmónicas como agentes de direccionamiento y liberación controlada gracias a la capacidad de estas nanopartículas de unir moléculas en superficie (tales como agentes de transfección génica), y también se han desarrollado estrategias enfocadas a la imagen diagnóstica, gracias a sus excepcionales propiedades ópticas, e incluso se está investigando su aplicación directa en terapia como agentes de hipertermia y radioterapia bajo excitación externa (Fig. 12).

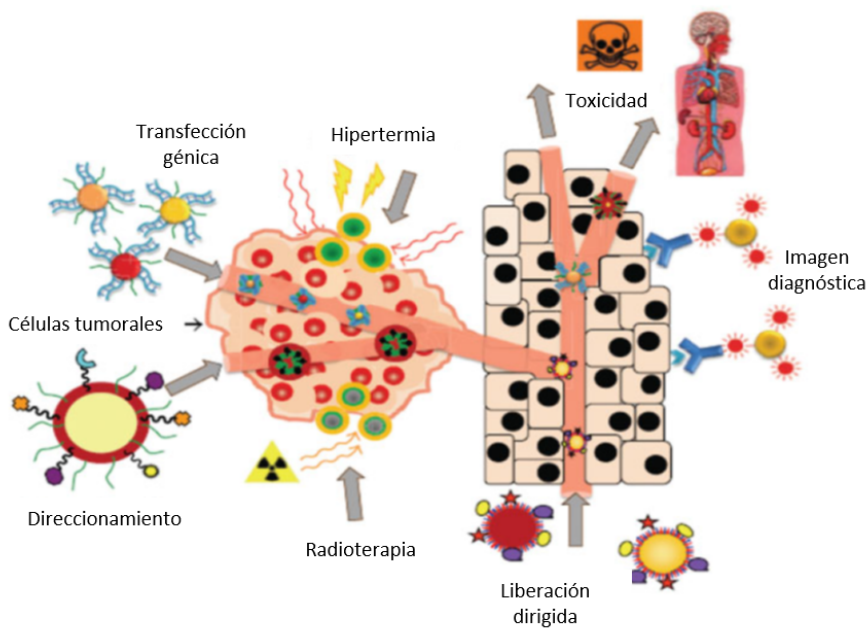


Figura 12. Diferentes funciones de las nanopartículas plasmónicas en la terapia del cáncer. (Adaptado de Conde *et al.*, 2012).

Como ya hemos mencionado, las nanopartículas plasmónicas no están exentas de posibles efectos perjudiciales, por lo que es necesaria la evaluación de su posible toxicidad en el organismo de manera pormenorizada. No obstante, esta toxicidad intrínseca, en el caso de las AgNPs, comienza a ser abordada como una ventaja en el caso de los procesos tumorales, ya que se pueden considerar como un agente coadyuvante a otras terapias, o incluso se puede administrar como terapia *per se*, gracias a la generación de ROS, o vinculada a ablación láser en tratamientos de hipertermia. Aunque la toxicidad intrínseca de las AgNPs resulte una clara ventaja en el caso de nanoterapias antitumorales hace que el direccionamiento de las nanopartículas al tejido tumoral sea de vital importancia para evitar posibles efectos perjudiciales en tejidos sanos.

Por otro lado, si planteamos un abordaje de las nanopartículas plasmónicas desde un prisma más físico-químico se facilita el entendimiento de su aplicación en biomedicina (Fig. 13).⁹²

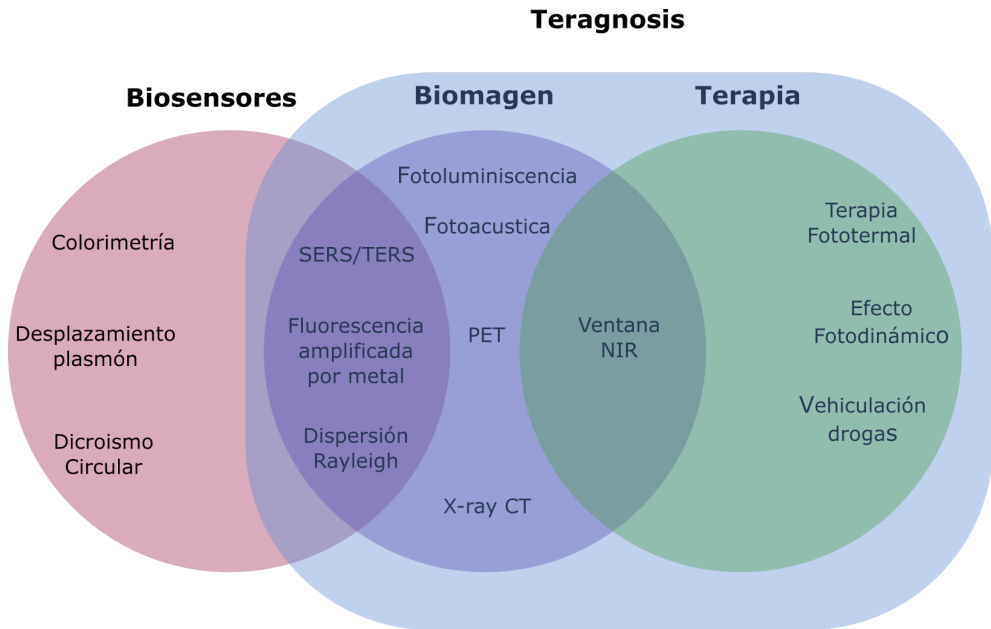


Figura 13. Esquema de los potenciales usos biomédicos de nanopartículas plasmónicas en función de sus propiedades físico-químicas. Adaptado de Kumar et al., 2016.

El diagnóstico precoz y el seguimiento de los procesos cancerígenos en los primeros estadios de la enfermedad son primordiales para la resolución positiva de la enfermedad. Las propiedades ópticas de las nanopartículas plasmónicas permiten el desarrollo de métodos diagnósticos precisos, poco invasivos y que demandan pocos requerimientos técnicos para su evaluación. La interacción con moléculas de interés en determinadas condiciones induce un desplazamiento del máximo del plasmón superficial, lo que provoca un cambio del color observado por técnicas espectrofotométricas simples o incluso a *visum*. En los últimos años se han intensificado los estudios en dicroísmo circular, una técnica que permite estudiar la quiralidad de biomoléculas en las que las nanopartículas plasmónicas juegan un papel amplificador de la señal, promoviendo un aumento en la sensibilidad y resolución de los métodos de detección basados en la técnica del dicroísmo. Por otro lado, el fenómeno de dispersión Rayleigh que presentan las nanopartículas de metales nobles, así como el aumento de fluorescencia y el uso de las mismas en técnicas como el SERS y TERS han dado paso al desarrollo de nuevas técnicas de imagen en

el seguimiento y estudio de la evolución tumorigénica. Todas estas técnicas de imagen cobran especial interés al desarrollarse en la ventana biológica (entre 700 y 900 nm) donde los tejidos biológicos no absorben radiación, disminuyéndose, por tanto, la relación señal/ruido de la técnica.

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de nuevas nanopartículas metálicas conjugadas con agentes terapéuticos y ligandos proteicos dirigidos a receptores EGFR, para la terapia selectiva contra el cáncer. Para cumplir este objetivo se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis y caracterización de nuevas nanopartículas metálicas de oro y plata con grupos funcionales de interés para aplicaciones biomédicas.
- Direccionamiento activo a EGFR de los nanosistemas desarrollados.
- Evaluación de los nuevos nanosistemas como agentes teragnósticos en el tratamiento selectivo de tumores.
- Inicio del estudio en modelos animales de los nanosistemas desarrollados que sean susceptibles de transferencia a la clínica.

Capítulo 1

Materiales y Métodos

Síntesis, funcionalización y caracterización de las nanopartículas

▪ Materiales

Para llevar a cabo la síntesis y caracterización de las nanopartículas se utilizó cloruro de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), borohidruro de sodio (NaBH_4), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina hidrato (APY), ácido tánico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), albúmina de suero bovino (BSA), polivinilpirrolidona (PVP), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), Alamar Blue® y polietilenglicol (Mw ~20.000, PEG-20) adquiridos en Sigma Aldrich. El hidrocloreto de 2-mercaptoetilamina (cisteamina) se obtuvo de Alfa Aesar. La proteína A recombinante con la cola de cisteínas (rProteinA-Cys) fue donada por Biomedal. El anticuerpo monoclonal Anti-EGFR unido a Alexa Flúor 488 se adquirió en Santa Cruz Biotechnology. El nitrato de plata (AgNO_3), la N,N-dimetilformamida (DMF), el ácido 2 morfolinoetanolsulfónico (MES) y la agarosa tipo I estándar Pb se adquirieron en Panreac. Las membranas de diálisis OrDial D14 (Nominal MWCO 12,000-14,000) se adquirieron en Orange Scientific. El agua se purificó usando un sistema de purificación Milli-Q (18.2 M Ω) de Merck Millipore.

▪ Síntesis de nanopartículas

La mayoría de las síntesis de nanopartículas de plata y oro realizadas a lo largo de esta tesis están basadas en el método general desarrollado y optimizado en este trabajo (véase el Capítulo 2). Dicha metodología general sufrirá modificaciones, con objeto de optimizar el comportamiento de las nanopartículas en función del agente de recubrimiento, metal noble y/o aplicación principal a la que vayan dirigidas las nanopartículas.

De forma general, podemos decir que la síntesis de estos nuevos nanosistemas se basa en la reducción de una sal del metal noble, oro o plata, en una mezcla de disolventes, donde el mayoritario es siempre la DMF. La DMF es un disolvente polar aprótico que interviene en el proceso de síntesis tanto como agente disolvente de aquellos derivados orgánicos insolubles en agua como de agente estabilizante durante el crecimiento de la nanopartícula. Este disolvente es capaz de solvatar grupos funcionales catiónicos del ligando orgánico que, de encontrarse libres, interaccionarían con la superficie del metal durante la formación de la nanopartícula

impidiendo su correcta estabilización. Se aporta información más detallada del proceso en el capítulo 2.

El agente reductor empleado es el borohidruro sódico (NaBH_4). Se trata de un agente reductor fuerte que favorece la formación rápida de nuevos núcleos metálicos sobre el crecimiento de estos, por lo que, en general, se obtiene nanopartículas de reducido tamaño ($< 5\text{nm}$). El proceso de síntesis se lleva a cabo en frío, con el propósito de disipar el calor liberado durante la reacción de reducción, así como para normalizar las condiciones de temperatura evitando una dependencia ambiental (Fig. 14).



Figura 14. Metodología general de síntesis de nanopartículas plasmónicas desarrolladas en esta tesis. El NaBH_4 actúa como agente reductor y los derivados tiolados como agentes de estabilización y funcionalización. El Proceso tiene lugar en frío, bajo agitación vigorosa constante, siendo el medio de reacción el disolvente polar aprótico DMF.

Los agentes orgánicos que se usan para funcionalizar la superficie del nanosistema son en su mayoría compuestos tiolados, de reducido tamaño y que presentan grupos funcionales de interés en procesos biológicos. Así, por ejemplo, los grupos amino y carboxilo ofrecen la posibilidad del anclaje de biomoléculas vía enlace amida, o la interacción del sistema por afinidad de carga, como es el caso de los derivados de pirimidina, capaces de interactuar con biomoléculas cargadas negativamente como son los ácidos nucleicos. A continuación, se detallan

los protocolos de síntesis, funcionalización y purificación de los nanosistemas desarrollados en esta tesis:

Ag@NH₂. Las nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina (Ag@NH₂) se sintetizaron por reducción de nitrato de plata en presencia de cisteamina como agente de recubrimiento y DMF como medio de reacción. En una preparación típica, se adicionaron de manera secuencial 500 µL de una disolución acuosa de cisteamina (0,7 mmol) y 500 µL de una disolución acuosa de AgNO₃ (0,234 mmol) sobre 20 mL de DMF en baño de hielo y agitación vigorosa. Seguidamente, se añadieron gota a gota sobre la mezcla 3 mL de una disolución acuosa de NaBH₄ (210 mM). La reacción se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 20 minutos, después de los cuales las nanopartículas Ag@NH₂ resultantes se recuperaron mediante centrifugación (8000 rpm, 10 min), se resuspendieron en 20 mL de tampón MES (50mM) y se purificaron por diálisis frente a agua durante 48 h. La suspensión de nanopartículas resultante se liofilizó obteniéndose 21,2±0.4 mg de las nanopartículas Ag@NH₂ como un polvo de color marrón oscuro. El rendimiento de reacción, calculado como la cantidad de plata en las nanopartículas obtenidas respecto a la cantidad inicial de Ag⁺ utilizada en la reacción, fue del 79%.

Ag@NH₂@Ab. Para obtener las nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina marcadas con el anticuerpo monoclonal contra EGFR se desarrolló el siguiente protocolo. Una mezcla de 250 µL de Ag@NH₂ (1 mg/mL, en MES 50 mM, pH 6,5), 250 µL de EDC (5,2 mM en MES 50 mM, pH 6,5) y 2,5 mL de NHS (8,7 mM en MES 50 mM, pH 6,5) se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente, se adicionaron 250 µL de anticuerpo anti-EGFR (50 µg/mL) manteniéndose en agitación durante 24 h. La suspensión resultante de nanopartículas marcadas se centrifugó a 6000 rpm con objeto de lavar el exceso de anticuerpo no unido. El pellet de nanopartículas marcadas se resuspendió en una suspensión acuosa de BSA 0,1% (p/v) y se conservó en oscuridad a 4°C hasta su uso en posteriores ensayos.

Au@APY. La síntesis de las nanopartículas de oro funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina (Au@APY) se realizó por reducción de una sal de oro, HAuCl₄·3H₂O, utilizando un reductor fuerte, NaBH₄, en presencia del ligando orgánico (APY) en DMF. La relación molar [Au:APY] fue de [1:0,5]. En una preparación típica a 4 mL de una disolución de APY (4,79 mM; 2,7 mg) en DMF, se adicionan 30 µL de una disolución acuosa de

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,30 M; 13,25 mg). La suspensión se torna inicialmente amarilla y luego naranja. A continuación, se enfría la mezcla a 4°C (en baño de hielo) y se añade, de una sola vez y bajo agitación vigorosa, 1 mL de una disolución acuosa fría de NaBH_4 (150 mM; 3,97 mg). Al adicionar el reductor la mezcla adquiere inmediatamente un color rojo intenso. Transcurridos 10 min de reacción se detiene el proceso de reducción adicionando 10 mL de acetona, dejando la muestra en reposo y sin agitación hasta que se observa la aparición de flóculos. El coloide se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min, descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido se deja secar 24 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante (8 mg) se resuspende en un volumen adecuado de MES 50 mM o agua Milli-Q, para obtener una suspensión coloidal de color rojo a una concentración de 2 mg/mL de Au@APY. Finalmente, la muestra se conserva protegida de la luz y a 4°C hasta su uso.

Au@APY-aEGFR. La conjugación covalente del anticuerpo anti-EGFR a las nanopartículas se realizó mediante una carbodiimida estable en agua (EDC) en tándem con NHS. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 100 μL de una disolución acuosa de EDC (36,51 mM en MES 50 mM; pH 6,5) y 100 μL de una disolución acuosa de NHS (26,07mM en MES 50 mM, pH 6,5) a 2,8 mL de una disolución acuosa de MES (50 mM; pH 6,5) en baño de hielo y agitación vigorosa. Inmediatamente después, se añade 30 μL de anti-EGFR marcado con Alexa Flúor 488 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Transcurridos 15 min se adiciona, gota a gota, 1 mL de una suspensión coloidal de Au@APY (1 mg/mL en MES 50 mM) y se deja reaccionando durante 2 h. La suspensión coloidal resultante se resuspende en 1 mL de MES (50 mM). Finalmente, se adicionó BSA (0,1 %, p/v), se incubó la suspensión 30 min a temperatura ambiente, se centrifuga (10.000 rpm; 10 min) y se resuspende el sólido resultante en 1 mL de MES (50 mM).

Ag@APY. La síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (Ag@APY) en DMF se llevó a cabo por reducción de la sal de plata con NaBH_4 en presencia de 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina en una relación molar [APY:Ag] de [0,5:1]. En una preparación típica se disuelve APY (16,35 mg) en 20 mL de DMF a los que se adicionan 6 mL de una solución acuosa de AgNO_3 (39,82 mg) en agitación vigorosa y baño de hielo. El medio de reacción vira de amarillo intenso a amarillo transparente. Seguidamente, se adiciona gota a gota y en frío 4 mL de NaBH_4 (158 mM) y se observa que la suspensión cambia de amarillo a

marrón hasta finalmente marrón-rojizo. La reacción se deja proceder durante 20 minutos. Finalmente, la mezcla resultante se centrifuga (5000 rpm/20 min) y el sólido resultante se resuspende en 20 mL de MES (50mM, pH 6,5) y se dializa frente a agua durante 48 h. El coloide de nanopartículas resultante se conserva a 4°C y protegido de la luz hasta posteriores ensayos.

Ag@APY-aEGFR. Para obtener las nanopartículas de plata funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina y dirigidas a EGFR se adiciona una solución de EDC/NHS (480 μ L, 0,75 mg EDC y 0,3 mg NHS) a las nanopartículas Ag@APY previamente preparadas (500 μ L, 2mg/mL, MES 50 mM), incubándose la muestra durante 5 minutos antes de adicionar anti-EGFR marcado con Alexa Flúor 488 (20 μ L, 100 μ g/mL). La mezcla se mantiene en agitación durante toda la noche y en baño de hielo. Transcurrido este tiempo, se centrifuga la preparación para separar las nanopartículas del exceso de anticuerpo no unido. El pellet se resuspende en una disolución acuosa de BSA (0,1% p/v) y se incuba durante 2 horas para bloquear las uniones inespecíficas. Finalmente, la muestra se centrifuga a 15.000 rpm y el pellet de Ag@APY-aEGFR se resuspende en 1 mL de agua Milli-Q conservándose a 4°C hasta su uso.

Ag@TA+BH y Ag@BH+TA. La síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido tánico (TA) se ha realizado por reducción de AgNO₃, utilizando un reductor fuerte NaBH₄, en presencia de TA. La síntesis se llevó a cabo a 4°C (en baño de hielo) y bajo agitación vigorosa. El método se llevó a cabo en dos variantes que consistieron en modificar el orden de adición del TA, bien antes de la reducción con borohidruro o posterior a la adición de este. En la primera síntesis (Ag@TA+BH), se enfriaron 44 mL de agua Milli-Q en un matraz, posteriormente se añadió 1mL de disolución acuosa de AgNO₃ (1,67 mg de AgNO₃), se añadió 1mL de disolución de TA (2,2 mM; 3,4 mg TA), para finalizar se añadieron 5mL de disolución acuosa fría de NaBH₄ (6 mg de NaBH₄). La reacción se dejó proceder durante 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 min y se descartó el sobrenadante. A continuación se resuspendió el pellet con 2 mL de agua Milli-Q y se centrifugó bajo la mismas condiciones. En la segunda variante de síntesis (Ag@BH+TA), el TA se adicionó 15 minutos después de añadir la disolución acuosa de NaBH₄, siendo el resto del procedimiento idéntico al descrito para Ag@TA+BH.

Ag@TA. Se llevó a cabo una síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con TA donde éste actuaba tanto de agente de estabilización como de agente reductor. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Cao *et al.* con ligeras modificaciones.⁹³ La síntesis se realizó a temperatura ambiente y siempre bajo agitación vigorosa, siendo la relación molar [AgNO₃: TA] de [1:1]. Se prepararon 19,5 mL de una disolución acuosa que contenía 85,5 mg de TA, y se ajustó el pH a 7 añadiendo 280 µL de una disolución acuosa de NaOH (0,5 M). Después se adicionaron 0,5 mL de una disolución acuosa de AgNO₃ (0,1 M; 8,49 mg de AgNO₃). Se mantuvo la mezcla en agitación vigorosa y en oscuridad durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos y finalmente se resuspendió en agua Milli-Q.

- **Espectroscopía de UV-Vis para el estudio del plasmón superficial**

La amplia mayoría de espectros UV-Vis se registraron en un espectrómetro Ocean Optics equipado con un detector HR4000 (Dunedin, FL, USA) y una fuente de luz DH-2000 que combina lámparas de deuterio y halógena.

Para realizar las medidas se utilizaron cubetas de plástico y/o cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las muestras se diluyeron hasta obtener una absorbancia de partida del plasmón de superficie en torno a 0,8 U.A.

- **Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)**

Los espectros FTIR se registraron en un espectrómetro Bruker modelo IFS 66/s equipado con un detector DTGS (Billerica, MA, USA). Las medidas se adquirieron a 150 scans, 2,5 Hz y con una resolución de 3 cm⁻¹. Las muestras se prepararon previamente en pastillas de bromuro de potasio (KBr), tomando como blanco el espectro de una pastilla de KBr puro. Además, para algunas de las muestras se tomaron medidas de infrarrojo depositando las muestras líquidas en obleas de silicio.

- **Microscopía electrónica y análisis microestructural**

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión se realizaron en dos equipos diferentes:

-Philips CM-200, trabaja a 200 kV, con un filamento de hexaboruro de lantano (LaB6) y a una resolución puntual de 0,24 nm.

-TECNAI G2 F30, trabaja a 300 kV y posee un filamento de emisión de campo (resolución puntual de 0.20 nm). Equipado con un espectrómetro de energías dispersivas de rayos X (EDX), y un detector HAADF-STEM que permite analizar nanopartículas.

En ambos microscopios las imágenes de alta resolución se adquirieron con una cámara CCD y se analizaron con el programa Digital Micrograph (Gatan Inc.). El análisis de las imágenes de HAADF-STEM y los espectros fueron analizados con el programa ES Vision (FEI Company).

Las muestras fueron preparadas depositando unas gotas de la suspensión acuosa de las nanopartículas en una rejilla de cobre recubierta de carbono.

- **Estabilidad coloidal y diámetro hidrodinámico**

La distribución de tamaño hidrodinámico de las suspensiones coloidales de nanopartículas se determinó mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering). Por otro lado, la carga superficial de las nanopartículas, implicada en la estabilidad del sistema coloidal, se determinó a través de medidas de potencial zeta, ζ . Para ello, se usó el equipo Microtrac de Zetatrak Nanotechnology. Las medidas se adquirieron en condiciones ambientales de presión y temperatura. Las muestras se diluyeron previamente, normalmente 500 μL de la suspensión coloidal en agua Milli-Q o tampón MES 50 mM para obtener una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Estudio de estabilidad coloidal frente a pH**

Una vez diluida la suspensión madre de nanopartículas hasta que el máximo de absorción del plasmón se sitúe en torno a 0,8 UA se ajusta el pH de las muestras en valores comprendidos entre pH 2 y pH 10 mediante soluciones diluidas de HCl y NaOH. Los espectros se registraron a diferentes tiempos considerando como tiempo 0 una hora después de ajustar el pH.

- **Evaluación de la estabilidad con agentes de recubrimiento**

Con el fin de establecer el mejor agente de recubrimiento, las nanopartículas se incubaron con diferentes polímeros entre ellos PEG, PVP, BSA y proteína A, a una concentración final de agente del 1 % (p/v). Tras dos horas de incubación las suspensiones se centrifugaron y los sólidos

obtenidos se resuspendieron en el volumen original de agua y se registraron los plasmones por espectroscopía UV-Vis.

Seguidamente, se realizaron ensayos adicionales para determinar la concentración óptima frente a concentraciones crecientes de agentes de recubrimiento mediante pruebas de centrifugación y resuspensión en tampón MES (50mM) y choque iónico por adición de tampón PBS. Los resultados se evaluaron registrando los cambios producidos en el LSPR mediante UV-Vis.

Estudios de actividad en modelos celulares

- **Evaluación de la expresión de dianas moleculares en cultivo celular**

La detección cualitativa de EGFR en las líneas celulares se llevó a cabo por técnicas de inmunofluorescencia mediante la incubación con anti-EGFR marcado con el fluoróforo Alexa Flúor 488. A su vez, la confirmación del marcaje y su cuantificación se llevó a cabo mediante citometría de flujo incubando las diferentes líneas celulares con el mismo anticuerpo fluorescente.

Para las técnicas de inmunofluorescencia las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 1 mm de espesor (Goldseal No.1) y medio DMEM suplementado con 10% de FBS en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Tras 24 horas, las células se incubaron con anti-EGFR marcado con Alexa Flúor 488 (1:500). A los 60 minutos se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 3,8 % durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos usando Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y se visualizaron en un microscopio confocal Leica SP2.

- **Ensayos de entrada mediada y no mediada por receptor**

Las diferentes líneas celulares se cultivaron sobre un cubreobjetos de vidrio de 1 mm de espesor (Goldseal No.1) en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Transcurrido un periodo de 24 h, las nanopartículas se inocularon a una concentración final de 10 µg/mL y/o anti-EGFR Alexa flúor 488 (1:500). El

medio de cultivo se retiró a diferentes tiempos (entre 15 y 120 min), se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 3,8% durante 5 minutos. A continuación se lavaron con PBS 1X, se permeabilizaron con saponina al 0,1% durante 5 min y se lavaron de nuevo dos veces con PBS 1X. Los cubreobjetos se incubaron durante 5 min con Hoechst 33342 disuelto en agua destilada (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 5 min. Inmediatamente después, se retiró el reactivo y se realizaron 6 lavados con PBS 1X durante 8 minutos. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos usando Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y se visualizaron utilizando un Microscopio confocal Leica SP2 y microscopio de campo oscuro Leica DFC 450 C.

- **Evaluación de la viabilidad celular / citotoxicidad. Ensayo Alamar Blue®**

Se estudió la viabilidad celular utilizando el ensayo Alamar Blue® siguiendo el protocolo de la casa comercial (Sigma Aldrich). En un experimento típico, se sembraron 3.000 células por pocillo en una multiplaca de 96 pocillos. Transcurridas 24 h de incubación a 37°C para permitir la adhesión celular se renovó el medio de cultivo con medio fresco suplementado y con nanopartículas, estando comprendido el rango de concentración final de estas entre 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células se incubaron nuevamente a 37°C durante 24, 48 ó 72 h en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se renovó el medio de cultivo al 10 % v/v de solución alamarBlue™. Seguidamente, las células se incubaron en las mismas condiciones durante 2 h. Por último, se registró la emisión de fluorescencia a 590 nm excitando a 560 nm en un espectrofluorímetro multiplaca, POLARstar Omega (BMG LABTECH). Los resultados se analizaron mediante el test estadístico *t-student*.

- **Estimación de la carga de DNA. Ensayo en gel de retardo**

Para determinar la capacidad de carga de material génico en Au@APY, se tomó como modelo un plásmido pGFP de 8 Kb. Se mezclaron cantidades crecientes de Au@APY con una cantidad fija del plásmido de 500 ng para un volumen final de 30 μL en tampón HEPES (10 mM, pH = 7,4). Las relaciones Au@APY/pDNA ensayadas fueron 0,5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1, 5/1 y 10/1 (p/p). Las mezclas se incubaron 30 min a 37°C y se inspeccionaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% preteñido con

bromuro de etidio (BrEt) a 160 V durante 30 min en tampón TBE (0,0045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA). Las bandas resultantes se visualizaron en un transiluminador UV.

Evaluación de las nanopartículas en modelo animal

Se usaron ratones hembra BALB/c que se mantuvieron con un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas y se les permitió libre acceso a alimento y agua potable. Los animales fueron aclimatados durante un mínimo de 5 días antes del inicio de los experimentos. Todos los procedimientos utilizados en estos experimentos se realizaron en cumplimiento con el Comité de Ética de la Experimentación de la Universidad de Sevilla.

▪ Inoculación y caracterización del modelo tumoral

Se seleccionaron 9 ratonas sanas BALB/c adquiridas a la empresa Charles River de 8-10 semanas de vida, con un peso aproximado de 20 g y que no habían pasado por proceso de gestación.

Tras pesar a cada ratona para la determinación de dosis de anestesia (Ketamina (Ketolar) a 100mg/Kg + Diazepam (Valium) a 10mg/Kg) se procedió a la inoculación subcutánea en la glándula mamaria inferior izquierda con 1×10^6 células en 200 μ L de PBS estéril de cultivo celular 4T1.

Las ratonas se mantuvieron en el Servicio del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla en habitáculos libres de patógenos y en condiciones que cumplen las normas establecidas por la institución y de acuerdo con la normativa vigente.

El crecimiento del tumor se evaluó cada 2 días midiendo su tamaño con un calibre. No obstante, el tumor no se dejó crecer por encima de un tamaño que pudiera originar sufrimiento a los animales. Por ello, se evaluó el peso de las ratonas 3 veces por semana para registrar una posible bajada significativa de peso corporal o déficit de motricidad.

Pasado un período de 30 días desde la inoculación de las células cancerosas, o inferior en caso de signos de sufrimiento de los animales, se procedió a la anestesia de las ratonas en estudio mediante la administración intraperitoneal combinada de ketamina (ketolar 50 mg/mL, 100 mg/Kg) y diazepam (valium, 10 mg/kg) en la región inguinal. Tras evidenciar la sedación profunda, se procedió primero a la extirpación del tumor y seguidamente la extirpación del hígado, pulmones, bazo y riñones.

- **Inoculación del sistema Ag@APY en ratonas BALB/c**

Se aplicaron las nanopartículas Ag@APY o el control (suero fisiológico) vía intratumoral en un volumen final de 20 μl cuando los tumores presentaron un volumen de 80 mm^3 (1-3 semanas).

- **Medida del tumor**

Los tumores se midieron con calibre tres veces por semana. El volumen tumoral se determinó con la siguiente fórmula:

$$Volumen = \frac{(ancho)^2 \times largo}{2}$$

- **Estudio histopatológico**

Los órganos diseccionados fueron: corazón, hígado, pulmón, riñón, cerebro y músculo, y se fijaron en una solución de formol al 4%. Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina fueron:

a) Inclusión en parafina: las piezas fijadas se encuadran individualmente en unos cassettes y se introducen en un procesador de parafina donde son sometidas a baños sucesivos en alcoholes de graduación creciente, de modo que la deshidratación se realice paulatinamente, evitando la retracción de los tejidos. Por último, las piezas pasan por dos baños de xilol y otros dos de parafina líquida (60°C).

b) Formación de bloques de parafina y cortes histológicos: La inclusión o formación de los bloques de parafina se efectúa empleando moldes y un dispensador de parafina. El bloque de parafina debe contener la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”. Se realizaron secciones de 5 micras y se tiñeron con hematoxilina (colorante básico) y eosina (colorante ácido).

c) Tinción hematoxilina-eosina: Las piezas se hidratan incubando previamente en xilol y lavando en una batería de alcoholes decreciente. Una vez hidratadas se tiñen con hematoxilina durante 60 segundos en agitación suave. A continuación se sumergen las piezas brevemente en carbonato de litio, se lavan y secan para seguidamente teñirlas durante 60 segundos en un baño con agitación suave con eosina. Por último, las piezas se deshidratan nuevamente en una batería de alcoholes creciente finalizando con dos baños en xilol.

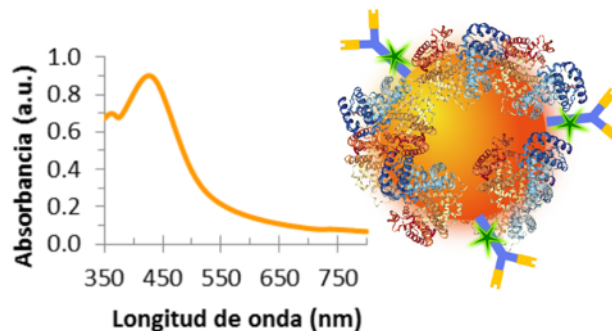
Montaje: Después de realizar la tinción se procedió al montaje con resina, evitando la formación de burbujas.

d) Observación y estudio al microscopio: El estudio histopatológico fue realizado bajo la supervisión de un patólogo experimentado en un microscopio de doble cabezal.

Capítulo 2
Síntesis *in situ* de nanopartículas
de plata funcionalizadas con
cisteamina
Ag@NH₂ como agente
teragnóstico

Resumen

Las nanopartículas de plata ofrecen un gran potencial para aplicaciones biomédicas debido a sus excepcionales propiedades ópticas y a su reducido tamaño. Concretamente, las nanopartículas de plata funcionalizadas en superficie con cisteamina podrían ser la base de nuevas terapias anticancerosas, que combinen el efecto citotóxico del núcleo de plata con la actividad antitumoral inherente de la cisteamina, capaz de inhibir la proliferación de células cancerígenas, así como suprimir la invasión y la metástasis. Sin embargo, la longitud de la cadena y la flexibilidad conformacional de la cisteamina, junto con su capacidad de unirse a la superficie de las nanopartículas de plata a través tanto del grupo tiol como del grupo amino, han hecho que la síntesis *in situ* de estas partículas sea una tarea especialmente desafiante. En este capítulo presentamos un método de síntesis *in situ* asistido por un disolvente que resuelve este problema. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron en profundidad por técnicas espectroscópicas, de microscopía electrónica, microanálisis así como por técnicas de dispersión dinámica de luz. Nuestro método de síntesis logra un rendimiento extremadamente alto y una elevada relación de recubrimiento superficial, así como una excelente estabilidad coloidal en un amplio rango de valores de pH, incluido el pH fisiológico. Además, hemos demostrado que las nanopartículas funcionalizadas con cisteamina obtenidas mediante este método pueden conjugarse eficazmente con un anticuerpo de direccionamiento de forma orientada, sirviendo como buenos agentes teragnósticos en modelos celulares.



Antecedentes

Las nanopartículas de metales nobles ofrecen un gran potencial en aplicaciones biomédicas debido a sus excepcionales propiedades, así como a por su capacidad de conjugarse a moléculas y biomoléculas de interés.^{94–103} Para este propósito, la estrategia más común es funcionalizar la superficie de la nanopartícula con grupos funcionales (principalmente grupos amino y/o carboxilo) a través del autoensamblaje de monocapas de tioles durante el crecimiento de los núcleos metálicos. Este proceso recibe el nombre de síntesis *in situ*.^{95–97} En este sentido, es importante indicar que los tioles de cadena corta, como es el caso de la cisteamina, son ideales para la funcionalización de nanopartículas dado que no incrementan de manera significativa el tamaño final del nanosistema, factor crítico para su uso en innumerables aplicaciones biomédicas. En el caso de los grupos amino que presenta la cisteamina, su interés radica en la posibilidad de conjugarlos a moléculas cargadas negativamente, tales como agentes quimioterapéuticos,¹⁰⁴ DNA,¹⁰⁵ y/o siRNA,¹⁰⁶ o incluso la posibilidad de unir de forma direccionada, mediante enlace amida, péptidos¹⁰⁷ y/o anticuerpos¹⁰⁸ por su extremo carboxilo terminal.

Aunque ya se ha descrito la síntesis *in situ* de nanopartículas de plata y cisteamina,¹⁰⁹ la concentración inicial de metal requerida para obtener las nanopartículas es extremadamente baja, por lo que su uso está poco extendido. Estas bajas concentraciones iniciales, que se traducen en bajas concentraciones de nanopartículas, podrían ser adecuadas en aplicaciones de detección,^{109,110} pero resultan demasiado bajas para la mayoría de formulaciones biomédicas. Por lo tanto, sigue siendo un desafío científico lograr la síntesis *in situ* de nanopartículas de plata altamente funcionalizadas con cisteamina en altas concentraciones y con buena estabilidad a lo largo del tiempo.

La cisteamina es un tiol de cadena corta aprobado por la FDA para el tratamiento de la cistinosis, que destaca por su amplia gama de aplicaciones, no sólo en el campo biomédico, con un uso potencial en el tratamiento de la malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la enfermedad de Huntington, o el cáncer, entre otros.¹¹¹ Cuando está unida de manera correcta a las nanopartículas, la cisteamina también puede actuar como anclaje de vectores de direccionamiento de fármacos (péptidos y anticuerpos de reconocimiento específicos),^{112–120} así como en

biosensores y sensores químicos.^{121–130} Ejemplos de cisteamina formando parte de nanosistemas con potenciales aplicaciones sensoras pueden ser la detección de compuestos explosivos como el trinitrotolueno (TNT)¹³¹ o contaminantes perjudiciales como el pentaclorofenol (PCP) mediante SERS.¹²⁶ Este último representa un ejemplo perfecto del proceso en el que las nanopartículas de plata son funcionalizadas con cisteamina mediante intercambio de ligando en lugar de la correspondiente aproximación covalente.

Con respecto a su actividad contra el cáncer, se ha demostrado que la cisteamina previene la metaplasia y la carcinogénesis inducida por radiación o productos químicos,^{130,132,133} inhibir la proliferación de células cancerosas,¹³⁴ suprimir la invasión y metástasis¹³⁵ e inducir la autofagia en células malignas.¹³⁶ En este sentido, una amplia gama de nanopartículas funcionalizadas con cisteamina han mostrado actividad antitumoral,^{137–141} sin embargo, ninguna de ellas está hecha de plata a pesar de ser un material con capacidad citotóxica. De hecho, la toxicidad de las AgNPs ha sido ampliamente explorada en el contexto de los agentes bactericidas debido a su potencial para superar la resistencia a los antibióticos, extendiéndose actualmente su uso al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.¹⁴² Como cualquier otro agente citotóxico quimioterapéutico, la plata debe ser vectorizada a las células tumorales para evitar efectos adversos sobre los tejidos sanos. En este sentido, la cisteamina ofrece la ventaja de actuar como un enlazador entre la AgNP y el agente de direccionamiento, proporcionando una capa de recubrimiento en la superficie de la nanopartícula formada por grupos amino capaces de asegurar la unión orientada de los anticuerpos de direccionamiento.

En este capítulo presentamos un nuevo método para la síntesis *in situ* de AgNPs funcionalizadas con cisteamina. Las nanopartículas optimizadas se han caracterizado por técnicas espectroscópicas, microscopía, análisis microestructural así como por técnicas de dispersión dinámica de luz. Además, se introdujo una capa adicional de complejidad al conjugar las nanopartículas a un anticuerpo de reconocimiento de EGFR, proteína diana sobreexpresada en un amplio número de tumores y que desempeña un papel importante en la patogénesis y progresión celular de estas células malignas.

Resultados y discusión

Desarrollo de un método rápido y en un solo paso de obtener nanopartículas de plata altamente funcionalizadas con cisteamina

En este capítulo abordamos la síntesis *in situ* de nanopartículas de plata con cisteamina mediante la reducción de AgNO_3 en presencia de cisteamina en dos medios de reacción diferentes, agua y DMF. Ambos disolventes son de naturaleza polar, pero mientras que el primero es prótico, el segundo es aprótico. Con el objeto de determinar las condiciones óptimas de síntesis se llevaron a cabo una serie de experimentos variando diferentes parámetros de la reacción tales como la relación molar [tiol:Ag], la concentración de NaBH_4 , el tiempo de reacción y la temperatura, para el caso de la reacción en ambos disolventes. No obstante, en las síntesis en agua no se obtienen nanopartículas estables en ninguna de las condiciones ensayadas.

En lo que se refiere a la relación molar [tiol:Ag] en el rango estudiado fue de [0,5:1] hasta [5:1]. La relación molar óptima resultó ser la 3:1, siempre referida a la síntesis en DMF, ya que la síntesis en agua no condujo en ningún caso a resultados satisfactorios. Relaciones molares inferiores a 3:1 dan como resultado nanopartículas con un recubrimiento superficial bajo y, por tanto, inestables, que agregan. Por otro lado, las relaciones superiores a 3:1 provocaban la desestabilización del coloide por exceso de tiol en el medio de reacción y la obtención de nanopartículas excesivamente pequeñas. La relación [3:1] obtenida para la síntesis en DMF se compara muy favorablemente con la descrita en la bibliografía para el caso de la síntesis en agua¹⁰⁹ que es extremadamente elevada ([40:1]). Además, la síntesis en DMF es reproducible y el coloide obtenido presenta una elevada estabilidad a largo plazo.

El tiempo óptimo de reacción se determinó monitorizando el proceso por espectroscopia de UV-Vis. La figura 15 muestra el espectro de UV-Vis de la suspensión coloidal de nanopartículas plata/cisteamina a diferentes tiempos de reacción en DMF. La altura del plasmón aumenta con el tiempo de reacción, alcanzando un máximo a los 20 min. Cabe destacar que cuando las nanopartículas se separan del medio de reacción mediante centrifugación y se resuspenden en agua (manteniendo la misma

concentración), el plasmón de superficie se estrecha y se desplaza a longitudes de onda menores (Fig. 15, línea dorada). Los cambios en el plasmón superficial indican que la nanopartícula, una vez sintetizada, es más estable en agua que en DMF.

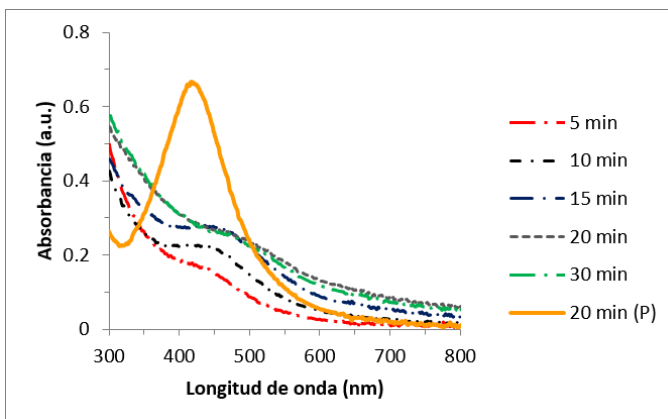


Figura 15. Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de plata/cisteamina a diferentes tiempos de reacción (5-30 min). La notación (P) se corresponde a la reacción a 20 min purificada por centrifugación.

Como se ha mencionado más arriba, todos los intentos de sintetizar AgNPs funcionalizadas con cisteamina en medio acuoso fallaron a las concentraciones de estudio, como se muestra por la ausencia del característico plasmón superficial en el espectro UV-Vis (Fig. 16). En el caso de la síntesis en agua, las nanopartículas crecen fuera de control debido a la maduración de Ostwald y la muestra se vuelve gris inmediatamente después de la adición del agente reductor, lo que indica la formación de grandes partículas de plata metálica (Fig. 16. Imagen inserta).

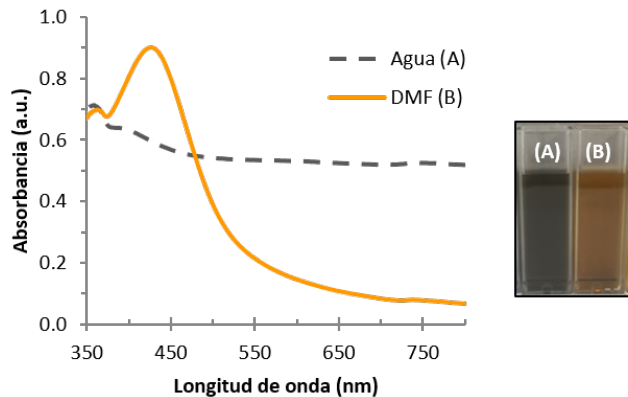


Figura 16. Espectros de absorción de los productos obtenidos usando agua (línea discontinua) o DMF (línea continua) como disolvente, después del proceso de purificación. Imagen inserta: fotografía de las suspensiones coloidales obtenidas en medio acuoso (A) o DMF (B) como disolvente.

Si analizamos los espectros UV-Vis de ambas muestras, la síntesis llevada a cabo en DMF exhibe un máximo del plasmón a 426 nm lo cual indica la presencia de nanopartículas de plata estables (Fig. 15). Por lo tanto, todas las subsecuentes técnicas de caracterización se aplicaron a las nanopartículas obtenidas usando la DMF como agente disolvente, de ahora en adelante Ag@NH_2 .

El método de síntesis y purificación de Ag@NH_2 desarrollado es muy sencillo, los requerimientos técnicos son de uso común en laboratorio siendo la totalidad del proceso fácilmente rastreable por observación del color de la muestra como se aprecia en la figura 17.

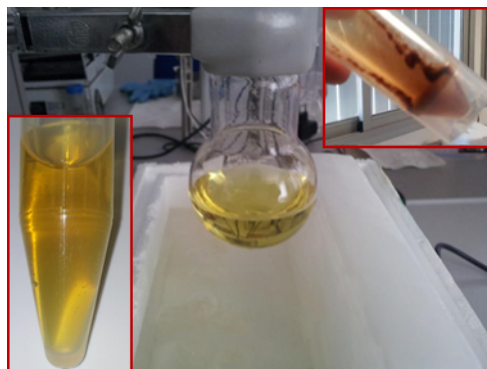


Figura 17. Proceso de síntesis y purificación de Ag@NH₂. Imagen central, reactor de síntesis con la cisteamina disuelta en DMF; imagen superior derecha, pellet centrifugado de la síntesis de Ag@NH₂; imagen inferior izquierda, nanopartículas Ag@NH₂ purificadas por centrifugación y resuspendidas en agua Milli-Q.

El hecho de que la síntesis tenga éxito en DMF pero no en agua se puede explicar en base a la naturaleza tanto del ligando como del disolvente. Se ha descrito que la cisteamina es capaz de unirse a la superficie de la plata a través tanto del grupo tiol como del grupo amino,¹⁴³ debido a que la molécula es capaz de adoptar una conformación *gauche* en la cual ambos grupos permanecen cerca de la superficie del metal (Fig. 18A). Este enlace bidentado conduce necesariamente a una disminución del grado de recubrimiento, una disminución de los grupos funcionales en superficie y de la carga, y por consiguiente, a un descenso en la estabilidad de las nanopartículas durante la fase de crecimiento. De acuerdo con nuestros resultados, la DMF, al ser un disolvente polar aprótico capaz de estabilizar especies catiónicas, como el grupo amino cargado positivamente del clorhidrato de cisteamina, dificulta su interacción con la superficie de las nanopartículas y promueve la interacción del ligando a través del grupo tiol (Fig. 18B), lo que resulta en un aumento del recubrimiento, como se discutirá más adelante. Además, otra ventaja notable de nuestra síntesis *in situ* frente al intercambio de ligandos o la adición de ligandos después de la síntesis, es que la presencia del agente reductor en el medio de reacción evita la formación de puentes disulfuro, inicialmente presentes o que podrían formarse en condiciones atmosféricas, eliminando la necesidad de llevar a cabo la funcionalización de las nanopartículas bajo atmósfera inerte.¹⁴⁴

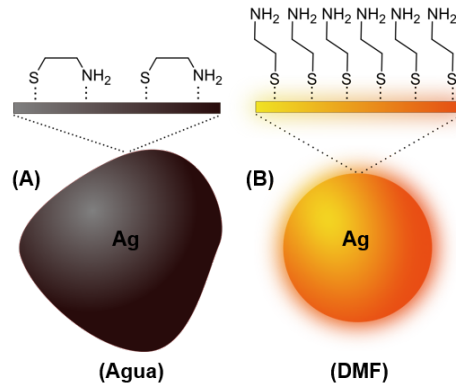


Figura 18. Representación esquemática de la conformación gauche (A) y trans (B) de la cisteamina sobre la superficie de las nanopartículas de plata funcionalizadas para la síntesis en agua y DMF.

Por otra parte, la naturaleza del disolvente juega un papel importante en la morfología de la monocapa de cisteamina autoensamblable (SAMs, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, en la superficie del oro Lee *et al.* han descrito que el tamaño de los pozos de la monocapa de cisteamina disminuye en presencia de un disolvente polar aprótico, como es el caso de la DMF, cuando es usado en lugar de uno polar prótico como el etanol o el agua.¹⁴⁵

La disposición de la cisteamina sobre la superficie metálica, dejando los grupos amino disponibles, confiere a esta última la capacidad de anclar moléculas con grupos carboxílicos libres gracias a la formación de un enlace covalente mediado por carbodiimidas. Esto reviste especial interés cuando se trata de vectorizar el sistema con anticuerpos, pues la unión covalente al extremo carboxilo terminal deja libre la fracción variable de este para que ejerza, de manera correcta, su función de reconocimiento.

- **El sistema coloidal Ag@NH₂ presenta óptima estabilidad en un amplio rango de pH, incluido el fisiológico**

Dado que la estabilidad de las nanopartículas Ag@NH₂ está influenciada por la carga que otorgan los grupos amino de la capa superficial, el pH del medio debe ser determinante. Los grupos amino se encuentran cargados positivamente a pH bajo, pero si se aumenta el valor de pH, la mayoría de los grupos presentes en superficie se encontrarán sin

carga y serán capaces de formar puentes de hidrógeno entre las nanopartículas. El valor de pH en el que tiene lugar este evento depende del pKa efectivo de las nanopartículas que, como norma general, es significativamente más bajo que el del ligando libre.¹⁴⁶ Con objeto de determinar el rango de pH en el que nuestro coloide es estable y no se produce agregación, se dispersaron nanopartículas en agua modificándose el pH en valores comprendidos entre 2 y 10. La estabilidad se evaluó en términos de plasmón de superficie por espectrometría UV-Vis. Como puede observarse en la figura 19, las nanopartículas Ag@NH₂ son estables en un amplio intervalo de pH. En valores de pH entre 2 y 5 las nanopartículas se dispersan correctamente, como revela el estrecho plasmón; a pH 6-7, las nanopartículas se acercan, pero no tiene lugar agregación. A pH 8, aparece una nueva banda a 600 nm debido al acoplamiento de los plasmones dipolares adyacentes.¹⁴⁴ A valores de pH mayores a 8 las nanopartículas agregan, como se puede concluir al observar la ausencia del pico de absorción en la región del plasmón. Estos datos ponen de manifiesto que nuestras nanopartículas se pueden usar en un intervalo bastante amplio en el rango de pH, incluyendo el pH fisiológico.

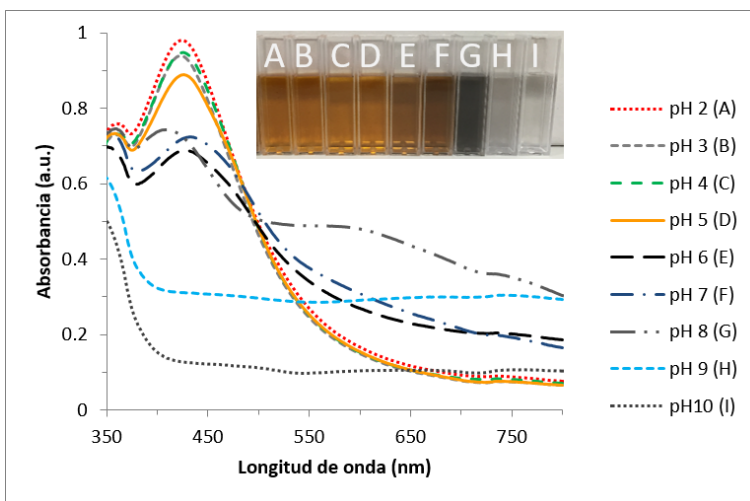


Figura 19. Espectros de UV-Vis de Ag@NH₂ resuspendidas en agua a diferentes valores de pH. El pH de la suspensión se ajustó adicionando las cantidades necesarias de NaOH (0,1 M) ó HCl (0,1 M). La Imagen inserta, de izquierda a derecha (A-I), se corresponde con los diferentes valores de pH entre 2 y 10.

- La espectroscopía FTIR demuestra la adecuada funcionalización superficial de la cisteamina en las Ag@NH₂.

La modificación de la superficie de las nanopartículas con cisteamina se analizó mediante espectroscopia FTIR. La desaparición de la característica vibración de torsión a 2,598 cm⁻¹ en Ag@NH₂ demuestra la unión del tiol a la superficie de las nanopartículas a través del átomo de azufre (Fig. 20). Además, mientras que esta vibración está todavía presente en Ag@NH₂ antes del proceso de purificación de las nanopartículas, debido al exceso de hidrocioruro de cisteamina sin reaccionar en el medio de reacción, desaparece después de que se lleve a cabo el proceso de diálisis (Fig. 21).

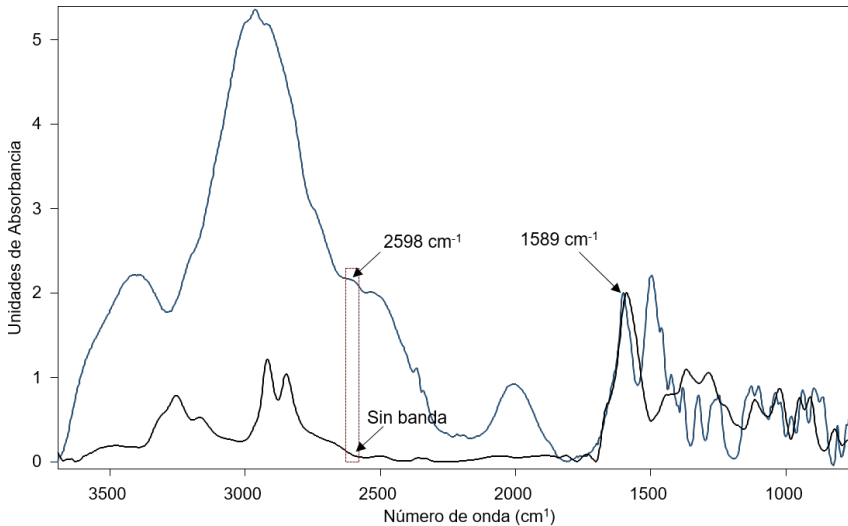


Figura 20. Comparación entre los espectros FTIR de Ag@NH₂ sintetizado en DMF antes (línea azul) y después (línea negra) del proceso de diálisis. Los espectros están normalizados respecto al pico 1589 cm⁻¹.

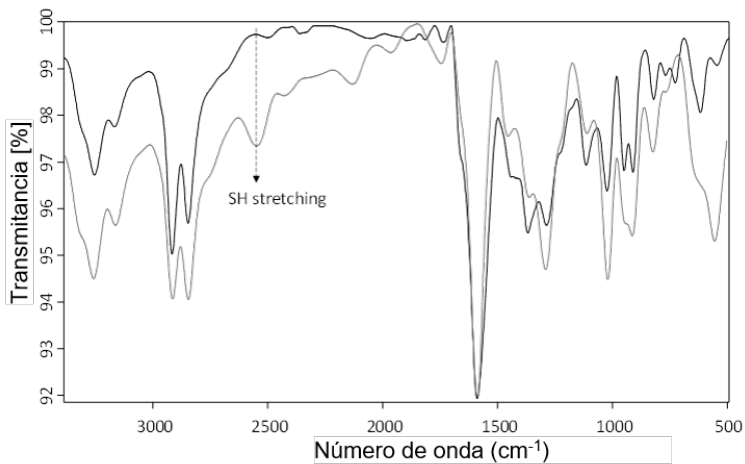


Figura 21. Comparativa entre los espectros FTIR de las nanopartículas Ag@NH₂ sintetizadas en DMF antes (línea gris) y después (línea negra) de dializar.

Adicionalmente, la característica vibración de flexión del NH₂ a 1589 cm⁻¹ permanece en Ag@NH₂ siendo, de hecho, la banda más intensa en el espectro. Este dato corrobora la principal ventaja de estas nanopartículas, confirmándose que el grupo amino permanece libre y disponible para la interacción con moléculas de interés, ya sea por conjugarse a través de fuerzas electrostáticas, en función del pH, o por la formación de enlaces covalentes mediado por carbodiimidas.

- **Ag@NH₂ es un coloide esférico, altamente monodisperso, estable y funcionalizado en un 10% en peso cisteamina/plata**

El análisis TEM de las nanopartículas Ag@NH₂ revela que son esféricas (Fig. 22a) y cristalinas, de acuerdo con su patrón de difracción de electrones en anillo que pudieron ser indexados en el sistema cúbico de la plata metálica (F_{m3m}, a=0,4 nm) (Fig. 22b). En la micrografía de alta resolución (HRTEM) mostrada en la figura 22c se han marcado los correspondientes planos (h k l). Por último, la figura 22d muestra la ampliación de una de las nanopartículas () orientada a lo largo de (1 1 1).

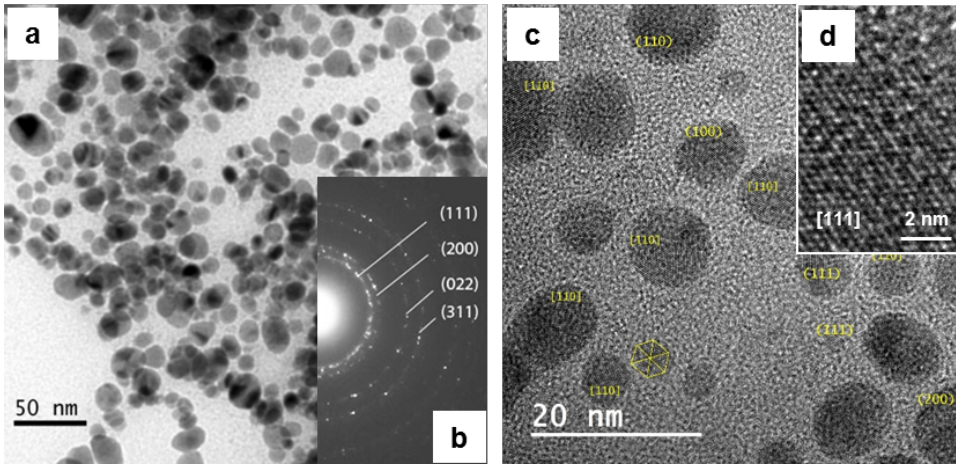


Figura 22. Caracterización microestructural de las nanopartículas Ag@NH₂. (a) Imagen TEM; (b) patrón EDX; (c) y (d) Micrografías HRTEM.

Así mismo, se determinó el tamaño de las nanopartículas tanto por TEM como por DLS. De acuerdo con el TEM su diámetro promedio es de 12 nm, lo que concuerda con el diámetro hidrodinámico obtenido por DLS de 15 nm (Fig. 23).

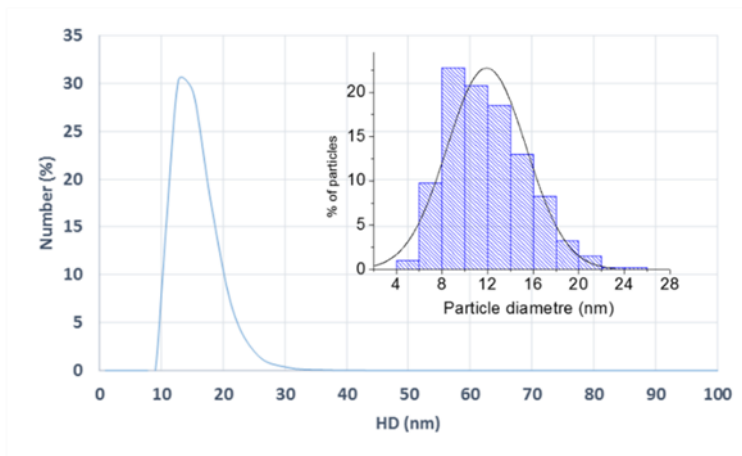


Figura 23. Distribución de tamaño hidrodinámico (HD) de Ag@NH₂ calculado por DLS. Imagen inserta: histograma que representa la distribución de tamaño calculado por TEM.

A su vez, el ζ de Ag@NH₂ es extremadamente alto (+36 mV a valores de pH de hasta 5, y permanece alrededor de +30 mV hasta pH 8), un resultado que está en consonancia con la gran estabilidad de estas nanopartículas a largo plazo. Estos valores tan elevados son un buen indicativo del elevado grado de recubrimiento en superficie, como se confirmará más adelante por EDX. Por el contrario, el ζ descrito para la síntesis *in situ* publicada en agua es de solo +18,7 mV a pH 4,¹¹⁰ un valor demasiado bajo para aplicaciones biomédicas (± 30 mV), y que necesariamente empeorará a valores de pH superiores dado que el ζ depende de la carga y los grupos amino se desprotonan a valores de pH superiores. Además, si analizamos más a fondo nuestros resultados a la luz de la síntesis descrita en agua, encontramos que la concentración inicial de plata ($\sim 10^{-5}$ M)¹⁰⁹ es varios órdenes de magnitud inferior que la alcanzada en nuestra síntesis (0,012 M). Suponiendo que las nanopartículas son esféricas, como lo indican las imágenes de TEM, se puede aplicar la ecuación 1.¹⁴⁷

$$C = \frac{c_M M_{Ag}}{\frac{4}{3}\pi r^3 \rho N_0} \quad (1)$$

Donde c_M es la concentración molar de AgNO₃, M_{Ag} es la masa molar de plata, r es el radio promedio de las nanopartículas, ρ la densidad de la plata (10,49 g/cm³) y N_0 el número de Avogadro. Esto da una concentración de nanopartículas de plata de hasta $7,6 \times 10^{-10}$ M, asumiendo un rendimiento del 100%, para la síntesis descrita en agua.¹⁰⁹ Para el caso de nuestra síntesis de Ag@NH₂, y teniendo en cuenta el rendimiento real del 79%, la concentración final es de $1,7 \times 10^{-7}$ M, lo que significa que nuestra concentración de nanopartículas es al menos 220 veces mayor que la obtenida en la síntesis descrita en agua.

Para completar la caracterización de las nanopartículas, se estudió su composición química por análisis EDX, llevado a cabo en el modo HAADF-STEM. Este método permite la cuantificación en regiones muy pequeñas para obtener la relación atómica de plata/azufre en las nanopartículas. Se registraron varios espectros con el haz enfocado en diferentes nanopartículas Ag@NH₂ (Figura 23a) con objeto de obtener una representación fiel del entorno de las nanopartículas. En la figura 23b se

muestra un espectro representativo. Se encontró que el porcentaje atómico medio es 90,5% de Ag y 9,5 % de S.

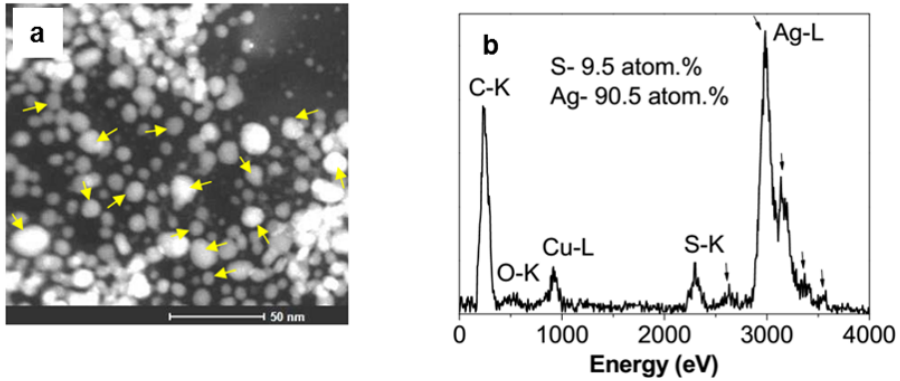


Figura 24. Análisis composicional de Ag@NH₂. (a) Imagen HAADF-STEM mostrando las posiciones correspondientes al análisis EDXS; (b) espectro EDXS representativo del promedio en el ratio atómico S-Ag, promediado sobre las posiciones marcadas.

Para determinar la relación atómica [Ag:S] en la superficie de las nanopartículas, se realizó un análisis de perfil de una serie de espectros EDX (Fig. 25). Se registraron 20 espectros a lo largo del perfil de la línea marcada en la imagen de barrido HAADF, que incluye los bordes y centros de 3 nanopartículas (Fig. 25a). En las figuras 25b y c se presentan los perfiles de composición referidos a Ag y S, respectivamente, en la tabla X se dan los porcentajes atómicos de Ag y S encontrados en una selección de puntos representativos. Mientras que los valores en el centro de las nanopartículas son muy similares al promedio de la relación [Ag:S], en los bordes de las nanopartículas el porcentaje de azufre aumenta considerablemente, alcanzando valores de más del 55%. Combinando la información de imagen con la composición química proporcionada por esta técnica, se puede concluir que las nanopartículas de plata están altamente funcionalizadas con moléculas del tiol, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en FTIR.

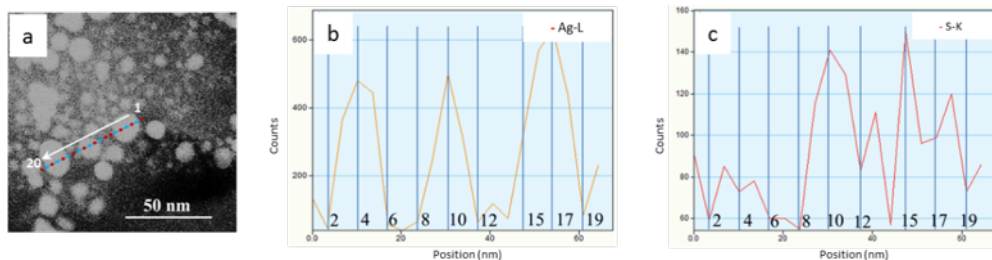


Figura 25. Análisis del perfil Ag/S para Ag@NH₂. (a) Imagen HAADF-STEM explorando la línea de puntos sobre la que se ha realizado el análisis EDXS; (b) y (c) perfil de composición de Ag y S, respectivamente, encontrado por análisis EDXS de izquierda a derecha en los puntos resaltados en rojo y azul en (a); (d) La tabla muestra los porcentajes atómicos de Ag y S encontrados en los puntos azules (a).

Tabla 1. Porcentaje atómico de Ag y S en los puntos representativos seleccionados.

Punto		2	4	6	8	10	12	15	17	19
Porcentaje atómico (%)	Ag	45,8	91,6	46,6	41,0	82,3	32,3	63,7	90,2	46,1
	S	55,2	8,4	53,4	59,0	17,7	67,6	36,3	9,8	53,9

Considerando que para un tamaño de partícula de 12 nm, aproximadamente el 14% de los átomos de plata están en la superficie, y teniendo en cuenta que el porcentaje atómico promedio [Ag:S] en las nanopartículas de Ag@NH₂ es [90,5:9,5], se estima que la relación cisteamina/plata superficial es [3:4], es decir, tres moléculas de cisteamina por cada cuatro átomos de plata en la superficie metálica de las nanopartículas. Esta cobertura superficial es notablemente más alta que la obtenida para otras síntesis *in situ* con otros tioles, como la ampliamente utilizada tiopronina (una molécula de tiopronina por cada tres átomos de plata en la superficie metálica de las nanopartículas),¹⁴⁸ y está de acuerdo con estudios sobre oro que muestran que el autoensamblaje de monocapas de cisteamina en la superficie del metal es más efectivo usando DMF como disolvente que el agua.¹⁴⁹ El grado de recubrimiento superficial se calculó de acuerdo a la Eq. (2), y los resultados se resumen en la Tabla 2.

$$FR = \frac{S (\%)}{Ag\text{ superficial} (\%)} \quad (2)$$

Tabla 2. Ligando (L) y fracción de recubrimiento (FR) de las nanopartículas Ag@NH₂ frente a las nanopartículas Ag@tiopronina.¹⁴⁸

	L	FR
Este trabajo	Cisteamina	0,76
Ref.	Tiopronina	0,33

Como se muestra en la Tabla 2, la fracción de recubrimiento de las nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina, obtenidas por nuestro método de síntesis *in situ*, es más del doble de la obtenida en el caso de las nanopartículas de plata funcionalizadas con tiopronina, por lo que el nivel de recubrimiento que alcanzamos con nuestra síntesis es mayor. Esto se debe, en gran parte pero no exclusivamente, al reducido volumen de la cisteamina, como puede apreciarse a partir de la Figura 26 en la que se muestra el volumen accesible al disolvente de ambos derivados orgánicos. Una proyección perpendicular a la componente principal del eje de inercia de la molécula proporciona áreas de van der Waals de 17,9 Å² y 23,2 Å² para cisteamina y tiopronina, respectivamente.

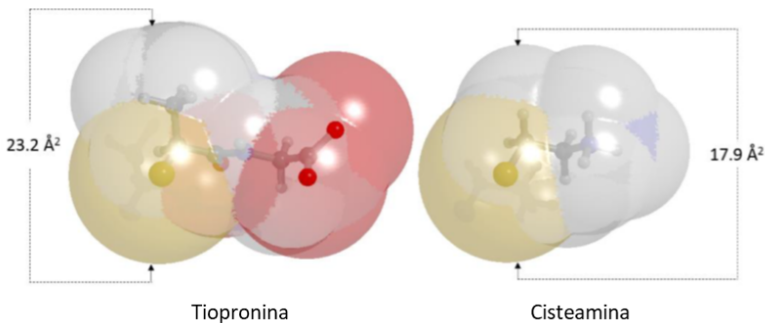


Figura 26. Superficie accesible al solvente de la tiopronina y la cisteamina que muestra el volumen excluido inducido por estas moléculas.

Además, cabe destacar que el elevado grado de recubrimiento obtenido en nuestra síntesis se traduce en que el rendimiento total (79% referido a la plata como reactivo limitante del coste) es notablemente alto.

Comportamiento biológico de Ag@NH₂ vectorizadas a células con sobreexpresión de EGFR

Las nuevas terapias antitumorales se centran en dirigir los agentes quimioterapéuticos a las células tumorales para evitar los efectos secundarios en los tejidos sanos. Para evaluar si nuestras nanopartículas se pueden vectorizar a dianas específicas de interés biomédico en la terapia del cáncer, se conjugaron a un anticuerpo contra EGFR. Hemos elegido este receptor debido a su relevancia en los tratamientos antitumorales actuales. EGFR es una glucoproteína transmembrana con actividad de tirosina quinasa, que participa en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, jugando un papel importante en la patogénesis y la progresión de una amplia variedad de tumores como gliomas y carcinomas de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, ovario, mama, vejiga y riñón. Por esta razón, este receptor se ha convertido en una diana de referencia en la terapia contra el cáncer, tanto en términos de inhibición específica,¹⁵⁰⁻¹⁵² como de vectorización.¹⁵³ Para conjugar el anticuerpo anti-EGFR (ab) con nuestras nanopartículas de plata funcionalizadas con cisteamina se usó una reacción de acoplamiento mediada por carbodiimida. En esta reacción se forma un enlace amida entre los grupos amino libres de la monocapa de cisteamina en Ag@NH₂ y el carboxilo terminal del anticuerpo, para producir Ag@NH₂@Ab (Fig. 27), asegurando que la orientación del anticuerpo en la superficie de las nanopartículas es apropiada para la interacción con su receptor, es decir, el paratopo del anticuerpo permanece libre. Una carbodiimida soluble en agua, EDC, se utilizó en tándem con NHS, para mejorar la estabilidad en agua del intermedio activado con ácido carboxílico.¹⁵⁴

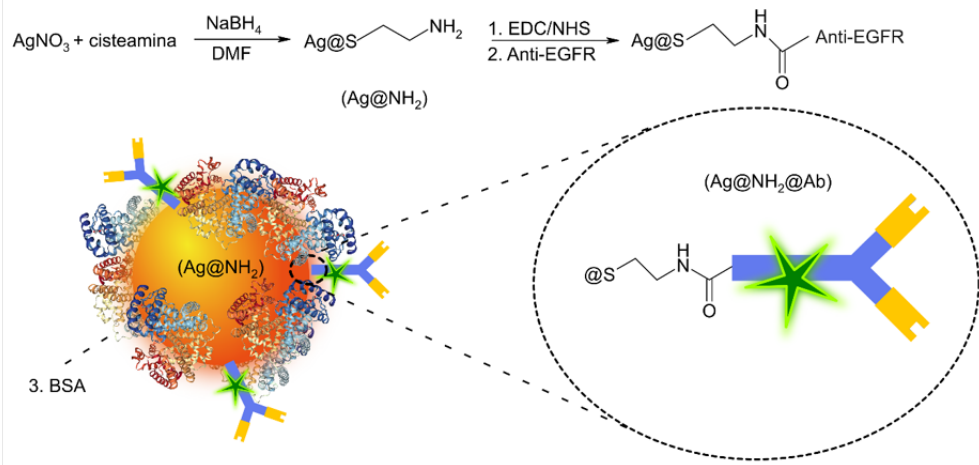


Figura 27. Esquema representativo de la funcionalización de Ag@NH₂ con el anticuerpo anti-EGFR marcado con AlexaFluor488 (Ag@NH₂@Ab) mediante reacción de carbodiimidas (paso 1 y 2) y posterior bloqueo de las uniones inespecíficas con BSA (paso 3).

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* y estudiar el comportamiento biológico de las nanopartículas Ag@NH₂@Ab se eligió la línea celular A431 como modelo. A431 es una línea celular de carcinoma epidermoide ampliamente utilizada como modelo en estudios terapéuticos dirigidos a EGFR, debido a la alta expresión que presenta de este receptor.¹⁵⁵ La citotoxicidad de las nanopartículas Ag@NH₂@Ab se determinó mediante el ensayo de viabilidad AlamarBlue[®] tras 48 horas de exposición de las células a las nanopartículas en concentraciones que varían de 5 a 100 µg/mL. Como se esperaba, los efectos nocivos de la plata comenzaron a ser observables (Fig. 28) sólo a las dosis típicas, similares a las descritas anteriormente para otras nanopartículas basadas en plata.¹⁵⁶

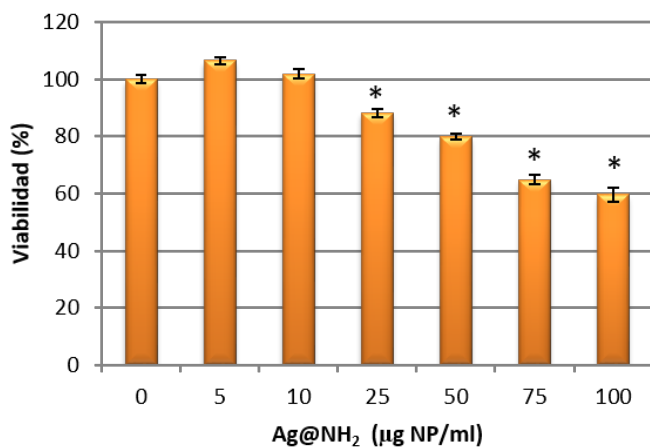


Figura 28. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@NH₂ medida usando el ensayo AlamarBlue®, siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad en la línea celular A431 transcurridas 48h tras la exposición. Las células expuestas a concentración 0, es decir, que no son inoculadas con las nanopartículas, constituyen el control. Los valores representan la media ± error estándar de la media (n=3), * denota diferencias estadísticamente significativas respecto al control (p<0.05).

Es importante destacar que a concentraciones por debajo de 50 µg de nanopartículas por mL no se observan efectos negativos sobre la viabilidad celular, lo que hace que estas partículas sean excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas.¹⁵⁷ Por esta razón, y para estudiar la captación de nuestras nanopartículas dirigidas, incubamos las células A431 con las nanopartículas a una concentración de 10 µg/mL y analizamos, mediante microscopía confocal, la internalización de estas partículas en las células después de un período de incubación de 48 h (Fig. 29).

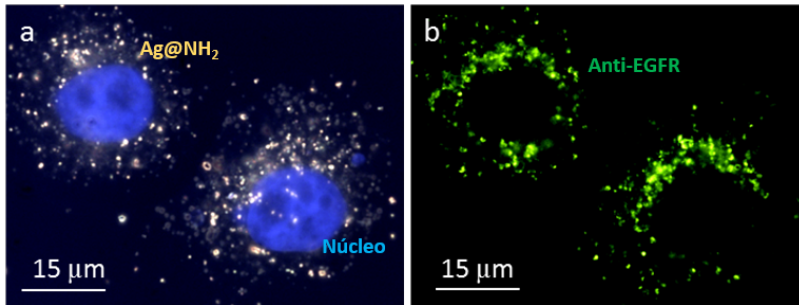


Figura 29. Imágenes de microscopía de células A431 incubadas con nanopartículas $\text{Ag@NH}_2\text{@Ab}$. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y el anticuerpo está marcado con AF488 (verde). (a) Imagen combinada de campo oscuro y fluorescencia mostrando la posición de los núcleos (canal azul) y plata (campo oscuro). (b) Imagen de fluorescencia (canal verde) donde se observa el anticuerpo presente en los conjugados $\text{Ag@NH}_2\text{@Ab}$. Imágenes capturadas a las 48 h tras 2 h de exposición a $10 \mu\text{g/mL}$ del nanosistema conjugado.

Este análisis demostró que las nanopartículas $\text{Ag@NH}_2\text{@Ab}$ podían detectarse tanto por microscopía de campo oscuro (Fig.29a) como por microscopía de fluorescencia (fig. 29b), lo que sugiere la posibilidad de su uso para aplicaciones teragnósticas.

Conclusiones

Nuestro método de síntesis posee un alto rendimiento y produce nanopartículas de plata de pequeño tamaño (12 nm), altamente concentradas y cuya superficie está extensamente decorada con grupos amino terminales, siendo la relación [S: Ag] de 0,76. Estas nanopartículas presentan una excepcional estabilidad coloidal en un amplio rango de pH que incluye pH fisiológico, presentando un ζ superior a 30 mV. Tanto la relación de cisteamina/plata superficial como el rendimiento total de la síntesis son notablemente más altos que los descritos en la literatura para otros tioles. Estas características hacen que nuestras nanopartículas sean excelentes candidatas en aplicaciones de administración de fármacos y transfección génica, así como en biosensores y sensores químicos. Además, nuestro método de síntesis podría ampliarse fácilmente para obtener nanopartículas basadas en aminotioles primarios, secundarios, ternarios o incluso cuaternarios de cadena más larga, y también podría aplicarse a otras nanopartículas de metales nobles, proporcionando un método de síntesis mejorado frente a las alternativas existentes.

A su vez, hemos acoplado de forma orientada estas nanopartículas a un anticuerpo dirigido contra EGFR, diana modelo en cáncer debido a su papel protagonista en la patogénesis y la progresión de muchos tumores sólidos. Estas nanopartículas dirigidas han demostrado tanto su capacidad de marcaje (por fluorescencia y microscopía de campo oscuro) como sus propiedades citotóxicas en las células de carcinoma epidermoide A431. Nuestros resultados sugieren que las nanopartículas obtenidas poseen un gran potencial en terapias contra el cáncer, debido a la posible sinergia en la actividad antitumoral de sus componentes (plata y cisteamina).

Las propiedades ópticas asociadas al plasmón de superficie de este nanosistema a dosis subtóxica permitirían su uso en técnicas de imagen y la asociación de estas a técnicas espectroscópicas aprovechando su efecto MEF, SERS y SEIRAS sin producir efectos indeseables en las células. Los datos preliminares obtenidos en este capítulo ofrecen un buen contraste en las muestras de inmunohistoquímica a dosis por debajo de sus potenciales efectos tóxicos.

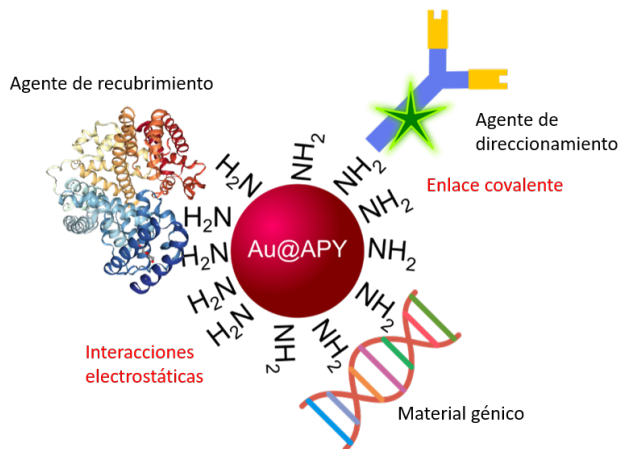
Capítulo 3
Nanopartículas de oro
funcionalizadas con 4,6-diamino-2-
mercaptopirimidina
Nanosistema teragnóstico en
terapia génica

Resumen

En el presente capítulo describimos el proceso de optimización de un método de síntesis *in situ* de nanopartículas de oro funcionalizadas en superficie con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (APY). APY es una molécula aminotiolada, de la familia de las pirimidinas, similar a las bases de los ácidos desoxirribonucleicos. El grupo tiol del derivado orgánico APY se quimisorbe en la superficie de la nanopartícula metálica durante el proceso de síntesis. Los anillos pirimidínicos protegen la superficie de la nanopartícula metálica, dejando expuestos al medio donde se encuentre el nanosistema sus grupos amino libres.

Como vimos en el capítulo anterior, las nanopartículas funcionalizadas con grupos amino disponibles permiten la unión covalente de anticuerpos, de manera orientada, por el extremo carboxilo terminal. La zona de reconocimiento antigénica queda, por tanto, libre para interactuar con su receptor. Adicionalmente, la carga positiva del grupo amino permite la conjugación de la nanopartícula con ácidos nucleicos, ya que estos poseen carga negativa, representando una herramienta poderosa en la terapia génica.

En el presente capítulo se han caracterizado estas nuevas nanopartículas mediante técnicas espectroscópicas y de microscopía. Además, se han llevado a cabo estudios que revelan la escasa o nula citotoxicidad del nanosistema, demostrando ser idóneas para aplicaciones biomédicas. Por último, hemos evaluado la capacidad del sistema de transfectar DNA en cultivos celulares.



Antecedentes

El proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células en el organismo, conocido genéricamente como cáncer, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, con más de 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas, según datos de la Organización Mundial de la Salud. A pesar de la intensa investigación en el área oncológica, se espera que aumente en un 70% el número de nuevos casos en las próximas dos décadas.¹⁵⁸

La compleja idiosincrasia que caracteriza a los procesos carcinogénicos dificulta enormemente la lucha contra esta patología, siendo la heterogeneidad de la enfermedad, la aparición de resistencias a fármacos y la toxicidad sistémica del tratamiento, los principales retos a los que se enfrenta su terapéutica.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ A los problemas derivados de la terapia se suman los debidos a la diagnosis, que debe ser temprana para que el tratamiento sea más efectivo. Por todo ello, existe una clara necesidad de crear sistemas que permitan tanto el direccionamiento como la acumulación de principios activos y marcadores diagnósticos en el tejido tumoral.¹⁶²

Los sistemas coloidales basados en nanopartículas de oro (de ahora en adelante AuNPs) se presentan como una prometedora alternativa para paliar este doble problema, gracias a su capacidad de anclar y transportar en superficie activos de interés como, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste y/o de direccionamiento e incluso material génico.¹⁶³ A su vez, La capacidad de amplificar señales electromagnéticas a una determinada frecuencia dentro del espectro visible capacita a las AuNPs en aplicaciones ópticas como agente diagnóstico, de contraste o incluso en terapia antitumoral por hipertermia.^{30,164,165} Este hecho, unido a su biocompatibilidad, posibilita el desarrollo de técnicas diagnósticas y de seguimiento no invasivas. En suma, la capacidad de transportar de manera dirigida activos terapéuticos de interés en superficie convierte a las nanopartículas plasmónicas en excepcionales agentes terapéuticos (Fig. 30).^{162,166,167}

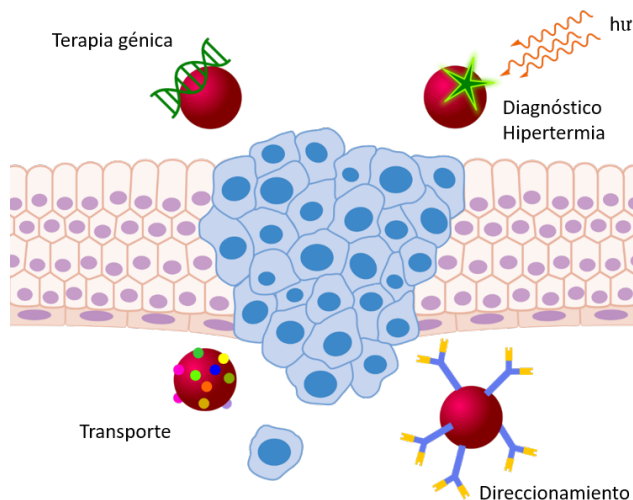


Figura 30. Esquema representativo de las diferentes aplicaciones de las AuNPs en la terapéutica del cáncer. Transporte de sustancias activas adsorbidas en superficie, direccionamiento activo por moléculas de reconocimiento específico ancladas en superficie, compactación de material génico para terapia génica, así como amplificación de la radiación electromagnética en diagnóstico y/o procesos de hipertermia.

La reducción química de una sal de oro en presencia de un agente estabilizante es la técnica más habitual para obtener suspensiones coloidales de AuNPs dada su sencillez, versatilidad y bajo coste. El agente estabilizante suele ser un ligando orgánico y, junto con el agente reductor, va a ser responsable del tamaño y la forma resultante de las nanopartículas.¹⁶⁸ Entre los agentes estabilizantes más utilizados destacan las moléculas orgánicas tioladas, ya que, debido a la afinidad del azufre por el oro, éste se quimisorbe en la superficie de las AuNPs durante su formación.¹⁶⁹ En este capítulo usaremos como agente estabilizante un derivado tiolado de la pirimidina, la 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, de ahora en adelante APY, siendo la primera vez que se describe su uso en la síntesis *in situ* de nanopartículas plasmónicas.

Las pirimidinas poseen importantes propiedades farmacológicas, entre las que destacan su actividad antiviral, anticancerígena, antibacteriana y antifúngica.^{170,171} Concretamente, los derivados de 2-mercaptopirimidina son capaces de inhibir la síntesis del RNA de transferencia, lo que los posiciona como prometedores agentes quimioterapéuticos.¹⁷² Además, estos derivados,

al presentar en su estructura un grupo tiol, pueden unirse a la superficie de las AuNPs. No obstante, a pesar del interés de las AuNPs en aplicaciones de teragnosis, y de la relevancia de los derivados de mercaptopirimidina, apenas hay estudios descritos de AuNPs funcionalizadas con estos derivados, y solo uno se refiere a APY y lo hace como agente bactericida.¹⁷³

Como ya hemos mencionado en capítulos anteriores, la vectorización de los agentes diagnósticos y/o terapéuticos es uno de los grandes retos de nuestro tiempo. Disminuir los efectos adversos de la actividad inespecífica en órganos no diana puede lograrse asociando dichos activos a sistemas que son particularmente reconocidos por dianas en la superficie del tejido de interés. Este derivado concreto, APY, dota a las nanopartículas de grupos funcionales amino en superficie. En este sentido, los grupos amino de APY permiten la unión de anticuerpos de direccionamiento mediante enlace covalente a su extremo carboxilo terminal. Gracias a la unión covalente entre la superficie rica en grupos amino de la nanopartícula y el extremo carboxilo terminal del anticuerpo se asegura su correcta orientación, quedando libre el segmento de reconocimiento.^{174,175} De esta manera, se consolida la nanopartícula como un vehículo capaz de dirigir agentes terapéuticos o marcadores a células o tejidos específicos.¹⁷⁶ La unión mediante enlace amida presenta una clara ventaja frente a la tradicional adsorción por incubación del nanosistema y el anticuerpo. La adsorción, que se produce de forma inespecífica, puede tener lugar indistintamente por el extremo de cola o por la zona de reconocimiento antígeno-anticuerpo. En estas condiciones “clásicas” se disminuye, por tanto, el reconocimiento del nanosistema por su tejido diana (Fig. 31).^{168,177}

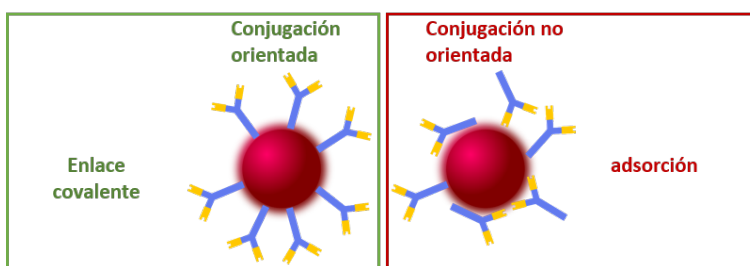


Figura 31. Representación de la orientación del anticuerpo sobre la nanopartícula en función del tipo de unión. Imagen no a escala.

Como hemos mencionado anteriormente, una de las dianas más estudiada, debido a su alta expresión en procesos cancerígenos, es el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés).¹⁷⁸ El EGFR es una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, cuya activación desencadena una cascada de señales moleculares que provocan proliferación celular, resistencia a la apoptosis, y angiogénesis.^{150–152} La desregulación en la expresión y la señalización de este receptor juega un papel crítico en la etiología del cáncer. Así mismo, este receptor se sobreexpresa en multitud de tumores como colon, mama y páncreas.¹⁷⁹

Partiendo de la premisa de que el desarrollo de tumores sólidos va ligado a procesos angiogénicos, y de que la permeabilidad de los nuevos capilares en torno al tumor es elevada debido a su mayor fenestración, las nanopartículas muy pequeñas (menores a 100 nm) son capaces de extravasar esta barrera y acumularse de forma pasiva en el tejido tumoral. A su vez, si marcamos la nanopartícula con proteínas que reconozcan receptores o antígenos que se expresen o sobreexpresen en las células tumorales, como el caso de EGFR, favorecemos de manera selectiva el proceso de acumulación de la nanopartícula en las células que sobreexpresan dicho receptor (Fig. 32). Este tipo de direccionamiento se conoce como direccionamiento activo y constituye una mejora sustancial al clásico direccionamiento por acumulación pasiva, dada la falta de especificidad de este último.¹⁸⁰

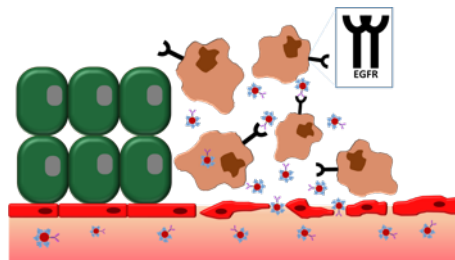


Figura 32. Representación ideal de un tejido tumoral al que se han vectorizado AuNPs para EGFR. Las fenestraciones y la amplia irrigación del tumor permiten el acúmulo pasivo de las nanopartículas. La funcionalización con anti-EGFR de las AuNPs favorece el reconocimiento y acumulación por el tejido tumoral diana.

Los recientes avances en terapia génica tales como el desarrollo de los sistemas “*knock-out*” basados en CRISPR, entre otros, auguran el crecimiento

exponencial de herramientas basadas en ingeniería genética en el futuro cercano de la clínica. Si bien, los avances en esta tecnología se ven frenados en gran medida debido al obstáculo que suponen las barreras biológicas al transporte de material génico, debido a sus propiedades físico-químicas. Por tanto, en la terapia génica se requieren vectores que transporten el material genético hasta el interior celular, ya que éste no se trasloca fácilmente a través de las membranas biológicas. Además, también hay que tener en cuenta la hostilidad del ambiente biológico al que se enfrenta este material génico hasta encontrar su célula diana. Este ambiente, repleto de DNAasas, entre otros mecanismos que persiguen su degradación, hace necesaria su encapsulación en vectores de transporte que aseguren su integridad bioquímica. En la literatura se encuentra ampliamente documentado que los virus recombinantes producen una buena transfección del DNA, sin embargo, presentan serios problemas de inmunogenicidad, carcinogenicidad e inflamación.^{181,182} Estos desafíos se han tratado de solventar mediante el desarrollo de sistemas no virales basados en polímeros, dendrímeros y liposomas. No obstante, se trata de métodos menos eficientes que los sistemas virales.¹⁸³ En este sentido, los nanosistemas basados en AuNPs se presentan como una buena alternativa a los vectores virales y poliméricos.^{180,184,185} Pese a ello, no existen antecedentes en la literatura científica del uso del derivado APY en AuNPs como agente funcional para el transporte de material genético.

El objetivo del presente capítulo es sintetizar suspensiones coloidales de AuNPs con carga positiva gracias al recubrimiento *in situ* con derivados aminados de pirimidina. Se estudiará su morfología, propiedades físico-químicas, estabilidad coloidal así como su funcionalidad en ambientes biológicos. Se evaluará la toxicidad del nanosistema optimizado mediante estudios de actividad metabólica en ensayos *in vitro*. Por último, se evaluará tanto la capacidad de direccionamiento del nanosistema mediante un anticuerpo dirigido a EGFR, anti-EGFR, en líneas celulares que sobreexpresen el receptor, así como su uso como vector génico.

Resultados y discusión

Desarrollo de un sistema coloidal de AuNPs funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (Au@APY)

Basándonos en los buenos resultados obtenidos para la síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con tioles cortos (véase Capítulo 2), decidimos evaluar la metodología general de síntesis descrita sustituyendo tanto el metal noble como el recubrimiento funcional tiolado, por oro y un derivado aminado de mercaptopiridina, 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (APY), respectivamente.

En primer lugar, se evaluaron las condiciones de producción consideradas críticas para el método general de síntesis, como son la temperatura, tiempo de reacción, volumen, medio de reacción, relaciones molares de reactivos y métodos de purificación. Esta evaluación nos permitió demostrar que el método general de síntesis desarrollado en el Capítulo 2 es válido para la obtención del sistema basado en oro, como metal noble, y APY como ligando orgánico funcional. Si bien, fueron necesarias ligeras variaciones en las condiciones de síntesis para optimizar la estabilidad, dispersión de tamaño y forma de las nanopartículas desarrolladas en el presente capítulo, como veremos a continuación.

Tanto las fuentes bibliográficas como los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, véase el capítulo 2 ó el caso de la tiopronina,¹⁸⁶ revelan que en la mayoría de los casos la relación óptima [derivado tiolado : metal] es de [3:1]. Sin embargo, en el caso del derivado orgánico APY frente al oro la relación [0,5:1] condujo a la suspensión coloidal de nanopartículas más estable y con menor dispersión de tamaño. Presumiblemente, esto se debe a la presencia de un anillo aromático rígido en el derivado APY, lo que se traduce en un incremento del impedimento estérico en relación a otros derivados tiolados de cadena corta. Sencillamente el hecho de que APY sea más voluminoso que ligandos orgánicos tiolados como, por ejemplo, la tiopronina o la cisteamina, se traduce en que el número de moléculas que se pueden situar en la superficie de la nanopartícula sea menor.

En la figura 33 se muestra la estrategia de síntesis desarrollada, tras el proceso de optimización, para obtener un coloide de Au@APY de características adecuadas a nuestra aplicación.

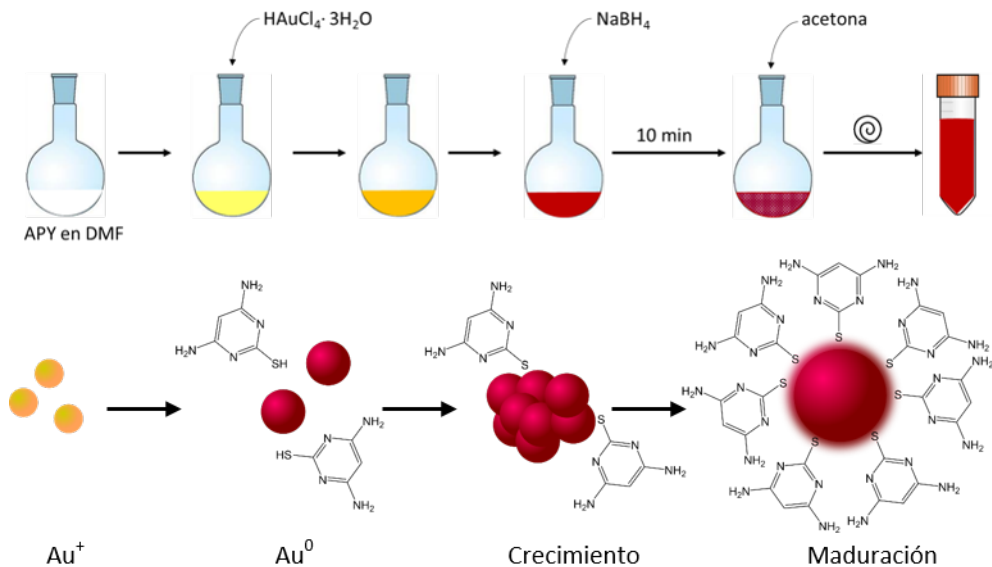


Figura 33. Representación esquemática del método de síntesis para Au@APY.

La suspensión coloidal de Au@APY presenta un color rojo intenso, característico de los coloides de nanopartículas de oro, resultando similar en apariencia al vino tinto (Fig. 34).

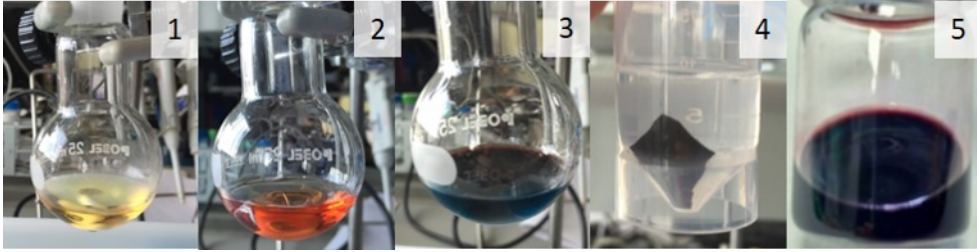


Figura 34. Fotografías representativas de los distintos estadios intermedios durante el proceso de síntesis de Au@APY. 1. Solución de APY en DMF; 2. Complejo Au/APY en DMF; 3. Suspensión coloidal de nanopartículas tras la reducción con borohidruro; 4. Pellet del sistema coloidal tras floculación con acetona y centrifugación suave; 5. Suspensión del sistema coloidal en agua Milli-Q tras el proceso de purificación.

El espectro de UV-Vis de Au@APY presenta un plasmón superficial estrecho con el máximo de absorción a 520 nm. Este resultado refleja que probablemente se trate de un coloide de AuNPs esféricas de pequeño tamaño y bajo índice de polidispersión (Fig. 35).¹⁸⁷

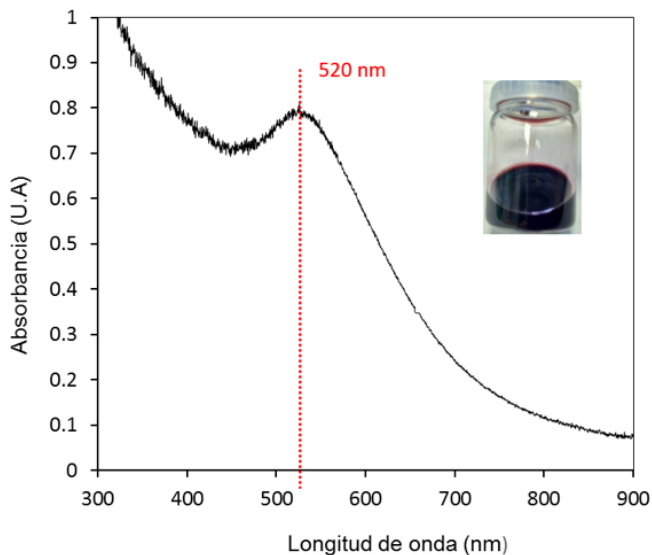


Figura 35. Espectro de UV-Vis del coloide resultante para la síntesis de las nanopartículas Au@APY. Se manifiesta el plasmón de superficie con un máximo a 520nm. Imagen inserta de la suspensión de nanopartículas donde se observa el color “rojo vino tinto” característico.

Asimismo, es importante resaltar que el método de síntesis desarrollado se produce en una única etapa y presenta un rendimiento muy elevado: 77%.

- **El análisis por TEM, STEM y EDX muestra que Au@APY es cristalino, de reducido tamaño, altamente monodisperso y extensamente recubierto en derivado orgánico**

A continuación, realizamos un análisis por TEM con objeto de caracterizar el tamaño y la morfología de Au@APY. A la vista de los resultados obtenidos por TEM la muestra de Au@APY está formada por nanopartículas de tamaño uniforme y diámetro medio en torno a 5 nm (Fig. 36). Las nanopartículas son cristalinas, como se evidencia en la imagen insertada (Fig. 36a), donde se presenta el diagrama de difracción de electrones, cuya forma de anillos indica que el tamaño de los dominios cristalinos es nanométrico. Cada anillo representa una familia de planos de los dominios cristalinos difractados. En la figura 36b se ha marcado el espaciado interplanar de los planos (2 0 0) del oro. Conjuntamente, se muestra en detalle una ampliación de una de las nanopartículas donde se aprecia el contraste debido a la geometría icosaédrica de la misma. Además se obtuvieron imágenes en modo STEM, en este caso el contraste de la micrografía se obtiene directamente del espesor y de la composición química de la muestra, a mayor número de electrones en la interacción más brillo se observa en la imagen (Fig. 37a, c y e).

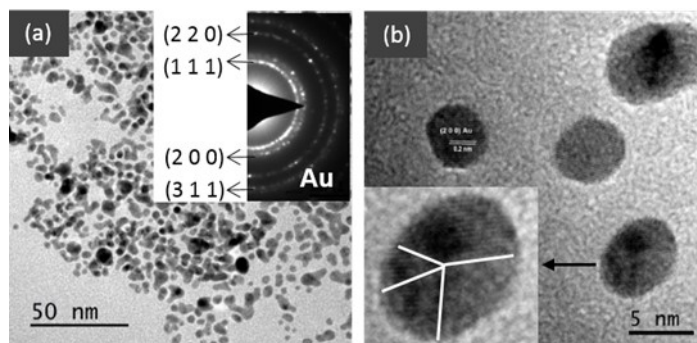


Figura 36. Microcaracterización de Au@APY. (a) Micrografía TEM y su correspondiente diagrama de difracción de electrones. (b) Micrografía TEM a mayor resolución y detalle de una nanopartícula ampliada en la esquina inferior izquierda.

En las imágenes de HRTEM es muy difícil observar moléculas orgánicas, debido a que están formadas por átomos muy ligeros que ofrecen poco contraste. No obstante, hemos podido confirmar la presencia de estas moléculas en Au@APY mediante análisis cualitativos HRTEM/EDX (Fig. 37). El análisis químico se ha realizado a lo largo de un perfil (marcado con línea roja en la figura 37a, c y e, donde se han examinado cinco puntos. Los resultados de las cinco medidas del perfil se representan en la figura 37g.

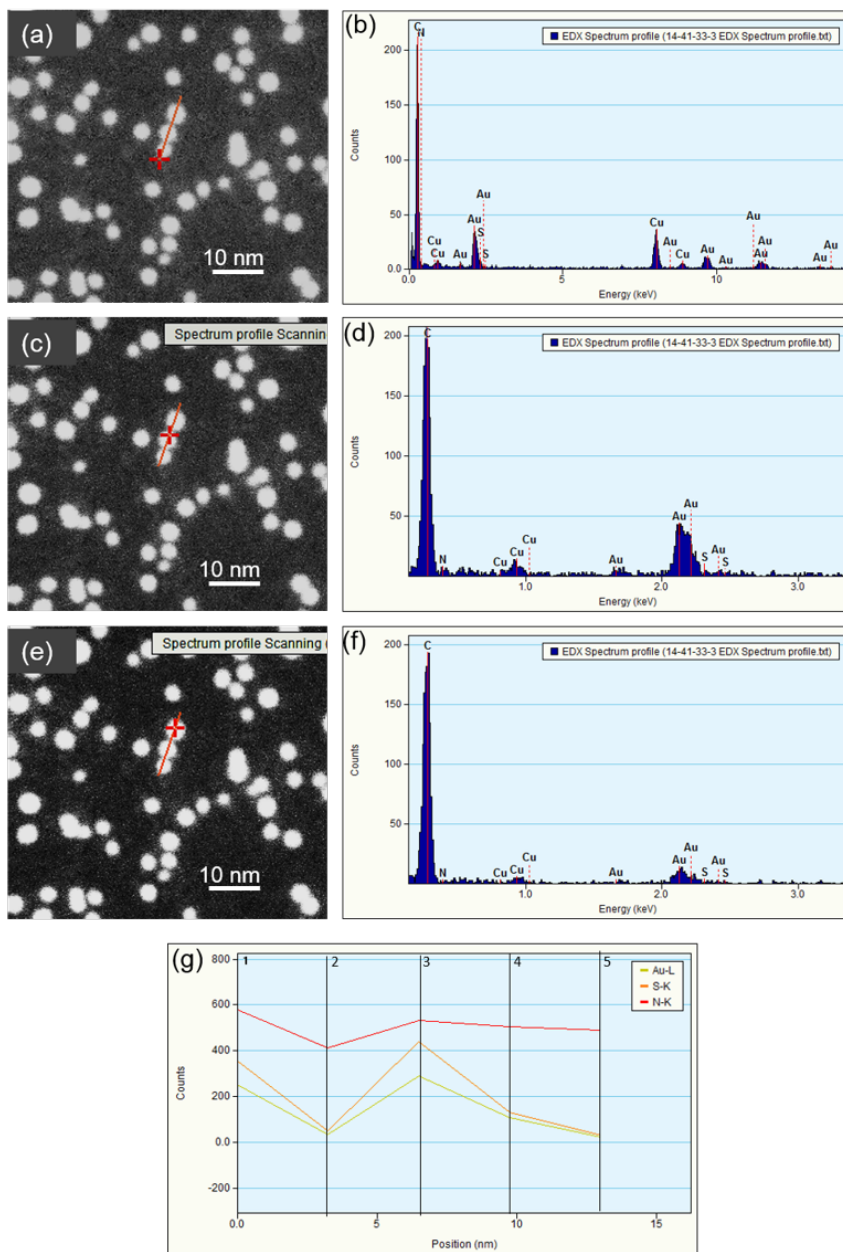


Figura 37. Microcaracterización y microanálisis de la suspensión coloidal de nanopartículas Au@APY. (a) (c) y (e) Imágenes STEM mostrando en rojo el punto del perfil donde se ha realizado el análisis. (b) (d) y (f) Espectros EDX correspondientes a cada una de las medidas. (g) Representación gráfica del análisis químico de oro, azufre y nitrógeno a lo largo del perfil.

Los puntos indican cómo va variando la cantidad de cada elemento a lo largo de la línea. El primer punto corresponde al espectro presentado en la figura 37b. En el espectro se observan las líneas de oro, azufre, carbono y nitrógeno, además de las líneas de cobre de la rejilla. En este punto apenas se detecta azufre ni nitrógeno, sólo se ven claras las líneas de oro. En el espectro correspondiente al punto número 3, que delimita el borde de la segunda nanopartícula, se aprecian dos pequeños picos, uno de azufre y otro de nitrógeno. El espectro correspondiente al punto número 4 de nuevo revela que sólo encontramos los picos correspondientes al oro. En el interior de la misma, la relación Au:APY es mayor, por eso se observa en su mayoría la presencia de oro y apenas se detecta azufre y/o nitrógeno. En cambio en el exterior de las nanopartículas la relación Au:APY es menor y se detectan más cantidad de nitrógeno y azufre que en el caso anterior.

- **El análisis FTIR de Au@APY demuestra que el derivado orgánico está anclado a la superficie por el grupo tiol dejando libre los grupos amino**

Con objeto de evaluar la funcionalización superficial del coloide se procedió a su estudio mediante espectroscopía de infrarrojo. La comparación de los espectros FTIR de APY y Au@APY (Fig. 38), demuestra claramente la funcionalización de las nanopartículas con APY durante el proceso de síntesis. El espectro de APY corresponde a una mezcla de sus dos tautómeros (Fig. 38 – esquema inserto) siendo, de acuerdo con los datos espectroscópicos, mayoritario el tautómero 2.

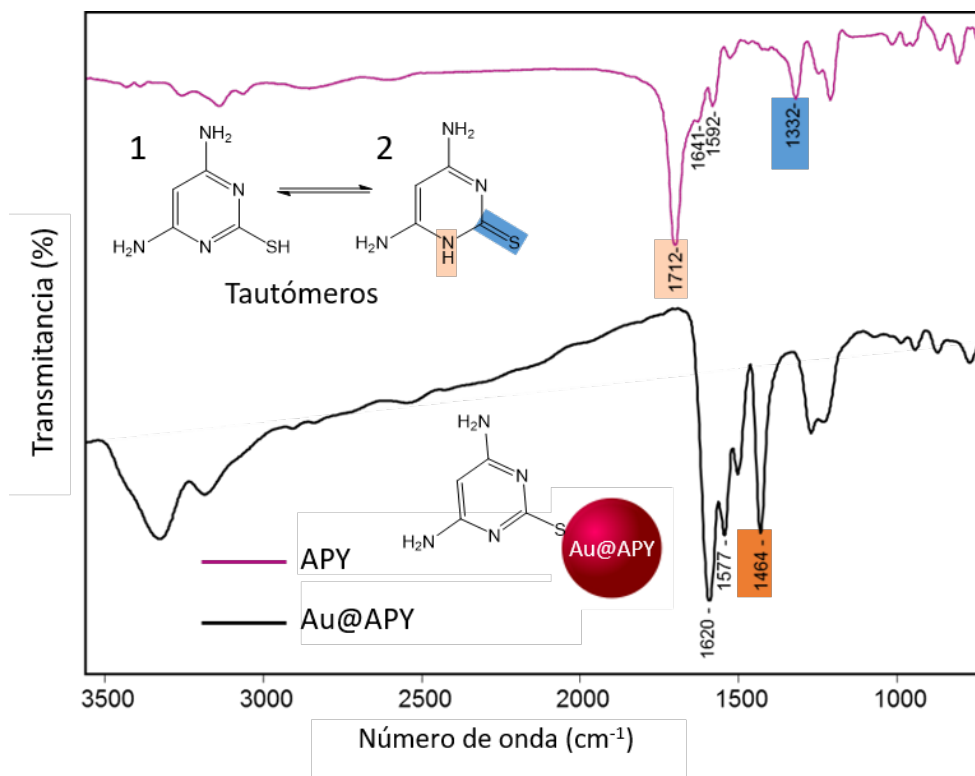


Figura 38. Espectros FTIR de APY (línea morada) y Au@APY (línea negra). Esquema inserto con la tautomería que presenta el derivado orgánico y su anclaje a la superficie de la nanopartícula.

Como cabría esperar, las vibraciones características del tautómero 2 (NH₂ a 1712 cm⁻¹ y C=S st a 1332 cm⁻¹) desaparecen en Au@APY, puesto que sólo el tautómero 1 puede unirse a las nanopartículas, y el exceso de APY no anclado al metal se ha eliminado durante el proceso de purificación de las mismas. Por otra parte, la banda característica del anillo aromático (C-C st a 1464 cm⁻¹) aumenta drásticamente de intensidad, probablemente debido a la transferencia de carga del anillo aromático a la superficie de la nanopartícula.

- El estudio por DLS de Au@APY presenta un sistema coloidal de pequeño diámetro y elevado ζ

Dos parámetros cruciales de las nanopartículas destinadas a aplicaciones biomédicas son su diámetro hidrodinámico (DH) y su estabilidad en medio acuoso, que en el caso de la estabilización por carga viene dada por el potencial zeta (ζ). Ambos parámetros se estudiaron por dispersión dinámica de luz (DLS) tanto en medio acuoso como en tampón MES, ya que en este último se realiza la conjugación de las nanopartículas al anticuerpo de direccionamiento.

De acuerdo a los valores de ζ obtenidos (Tabla 3) las nanopartículas presentan elevada estabilidad tanto en agua como en tampón MES. En ambos casos el valor absoluto del ζ es superior a $|30 \text{ mV}|$, valor mínimo establecido para considerar óptimo un coloide en aplicaciones biomédicas.¹⁸⁸ La carga superficial positiva corrobora los resultados obtenidos en la caracterización por FTIR, es decir, que la superficie de las nanopartículas se ha funcionalizado correctamente con APY durante su síntesis. La carga positiva se debe a que los grupos amino del ligando se protonan en suspensiones acuosas, lo que está íntimamente relacionado con su elevada estabilidad.

Tabla 3. Valores de ζ , diámetro hidrodinámico, conductividad e índice de polidispersión (PDI) de Au@APY en agua Milli-Q y tampón MES 50 mM.

Medio dispersante	ζ (mV)	Conductividad (uS/cm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
H ₂ O	(+) 60	17	57 ± 23	0,2900
MES	(+) 47	68	30 ± 6	0,1289

A la vista de los resultados, el diámetro medio por DLS es mayor que el que se obtiene por TEM, como es de esperar, dado que en este último no se tiene en cuenta el volumen de hidratación.¹⁸⁹

Aunque el ζ de las nanopartículas en agua sea superior al obtenido en tampón MES, también lo son su diámetro hidrodinámico (DH) y su índice de polidispersión (PDI). Este hecho, en principio contradictorio, podría justificarse por dos factores, por un lado la mayor conductividad que proporciona el MES

a la suspensión coloidal y, por otro, al ser el MES una molécula de tamaño muy superior a la del agua, la separación que proporciona entre las nanopartículas es también mayor, aunque el ζ resulte menor debido a un descenso en la movilidad como resultado del aumento de tamaño de la molécula solvatante. De hecho, al comparar la distribución de tamaños de las nanopartículas en ambos medios se observa que esta es más estrecha en la suspensión en MES que en la de agua.

Cabe mencionar que los valores obtenidos cumplen los requisitos establecidos en aplicaciones biomédicas, $DH < 200\text{nm}$, valor crítico a partir del cual pueden formarse trombos cuando las nanopartículas circulan por los vasos sanguíneos.¹⁹⁰

- **El sistema Au@APY presenta elevada estabilidad en un amplio rango de pH, incluido el fisiológico**

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas en medio acuoso frente a variaciones de pH, éste se modificó en el intervalo comprendido entre 2 y 9, registrándose los desplazamientos en el plasmón que indican si se produce agregación (desplazamiento a mayores longitudes de onda y bajada de intensidad) o estabilización (desplazamiento a menor longitud de onda y elevación de la intensidad en el máximo de absorción).¹⁹¹

Los resultados de este estudio muestran que las Au@APY son estables en un amplio rango de pH, comenzando a desestabilizarse a valores de pH superiores a 8, que coincide con el pK_a esperado por la presencia de grupos amino en superficie ($pK_a \sim 9$). La desestabilización se percibe tanto por los espectros de UV-Vis (Fig. 38), como a simple vista, ya que la suspensión coloidal vira del rojo al azul al acercarse las nanopartículas (Fig. 38 – imagen inserta).

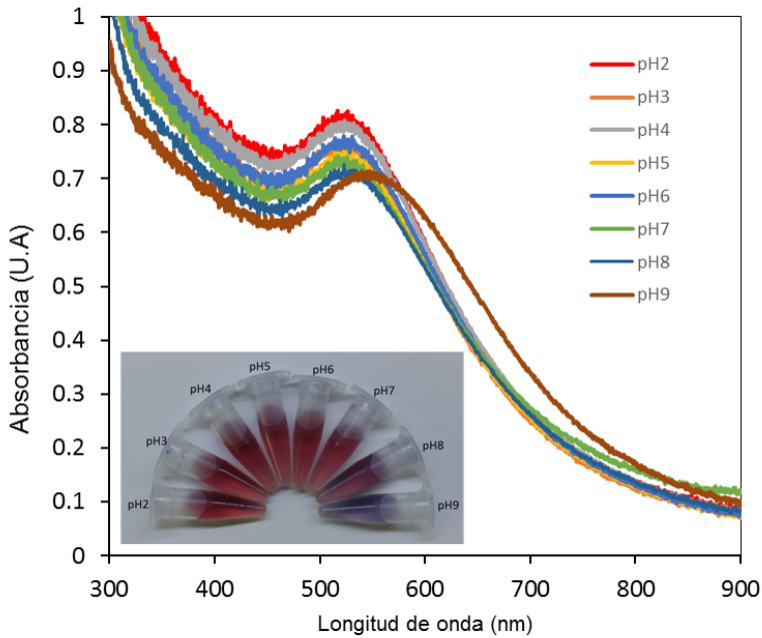


Figura 39. Ensayo de estabilidad de Au@APY a diferentes pH (2-9). Espectros UV-Vis y fotografía de las suspensiones coloidales (imagen inserta). El pH de la suspensión se ajustó adicionando las cantidades necesarias de NaOH (0,1 M) ó HCl (0,1 M).

Este fenómeno de desestabilización es una consecuencia de la naturaleza de los grupos amino que funcionalizan las nanopartículas, como sucedía con las nanopartículas descritas en el Capítulo 2. Los grupos amino tienen un comportamiento básico, y se protonan a pH inferior a su pKa. Si el medio dispersante presenta un pH mayor que su pKa, este grupo pierde la carga positiva y las nanopartículas dejan de repelerse entre sí, como consecuencia se desestabiliza el sistema llegando a flocular y/o agregar.

- **La BSA es un excelente agente de recubrimiento para el sistema Au@APY**

La evaluación de la estabilidad de las nanopartículas se ha completado con un estudio de posibles agentes de recubrimiento, tanto con polímeros sintéticos como con biopolímeros, ya que una vez funcionalizadas las nanopartículas con el anticuerpo de direccionamiento será necesario pasar

los grupos funcionales remanentes en superficie para evitar uniones inespecíficas en los ensayos biológicos. Además de la pasivación, el recubrimiento con polímeros también tiene la ventaja de aumentar aún más la estabilidad de las nanopartículas en suspensión, ya que aporta estabilización por impedimento estérico. Los polímeros y biopolímeros ensayados fueron: PEG, PVP, BSA y Proteína A. Los tres primeros se eligieron por ser comunes en el campo de aplicación, debido a su estabilidad y biocompatibilidad. Por otro lado, la elección de la proteína A se debe a la capacidad de esta de unir anticuerpos sin la necesidad de usar reacciones de acoplamiento. El efecto estabilizador de los agentes se evaluó por UV-Vis, registrando las modificaciones en el plasmón de superficie de las nanopartículas (Fig. 40).

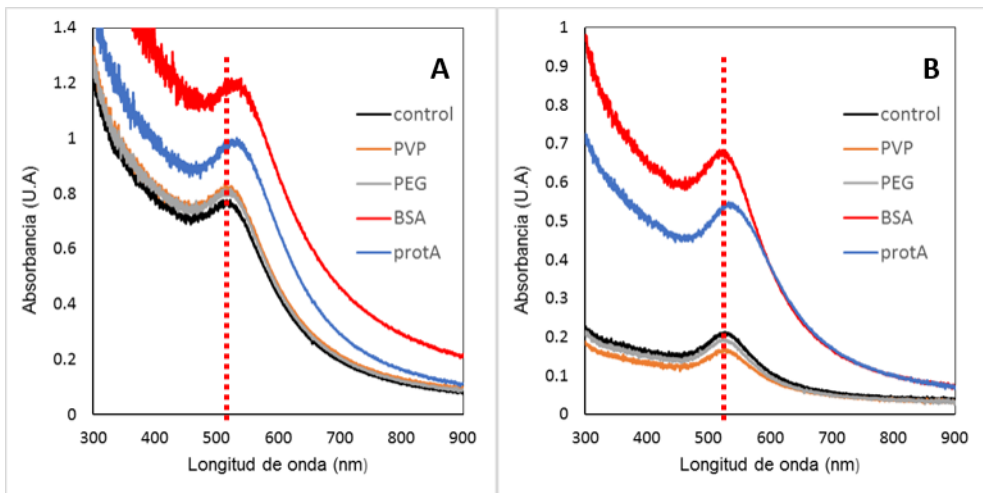


Figura 40. Espectros UV-Vis de las suspensiones acuosas de Au@APY tras recubrir con diferentes polímeros. La línea negra indica el control sin recubrimiento. (A) antes de centrifugar (B) recuperación del conjugado tras la centrifugación.

De acuerdo a nuestros resultados, todos los recubrimientos ensayados aumentan la absorbancia respecto al control de las Au@APY desnudas. El aumento de absorbancia se relaciona con la estabilidad coloidal. Esto se debe a que a la estabilización por repulsión electrostática, propia de nuestras nanopartículas, se suma la repulsión estérica que proporciona el agente de recubrimiento. Por otro lado, las nanopartículas recubiertas con BSA son las que mejor se recuperan tras los procesos de centrifugación (Fig. 40B), cabe

destacar que las nanopartículas desnudas no centrifugan en su totalidad. Por todo ello, se ha considerado la BSA como el mejor agente de recubrimiento para Au@APY, siendo por tanto este el agente de recubrimiento seleccionado para los siguientes experimentos.

Una vez elegido el recubrimiento se procedió a su optimización. Para ello, se ensayaron diferentes concentraciones finales de BSA, con el fin de establecer la concentración mínima necesaria para asegurar el completo recubrimiento de nuestro coloide sometiendo las muestras a choque iónico con tampón PBS. La eficiencia del recubrimiento se estimó en base al desplazamiento del plasmón tras el choque iónico. En la figura 41 se muestran los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Vis. En el caso de las nanopartículas desnudas (plasmón a 520 nm), el plasmón se desplaza a mayor longitud de onda (580 nm) al adicionar PBS, indicando la desestabilización parcial de las mismas. En cambio, el desplazamiento es poco significativo en las recubiertas con BSA, corroborando un cambio de las condiciones superficiales de las nanopartículas por el propio recubrimiento, más que un suceso de desestabilización. La mayor absorbancia se observó a concentraciones de BSA del 0,1 % (p/v), por lo que en los ensayos biológicos se tomó esta concentración como óptima.

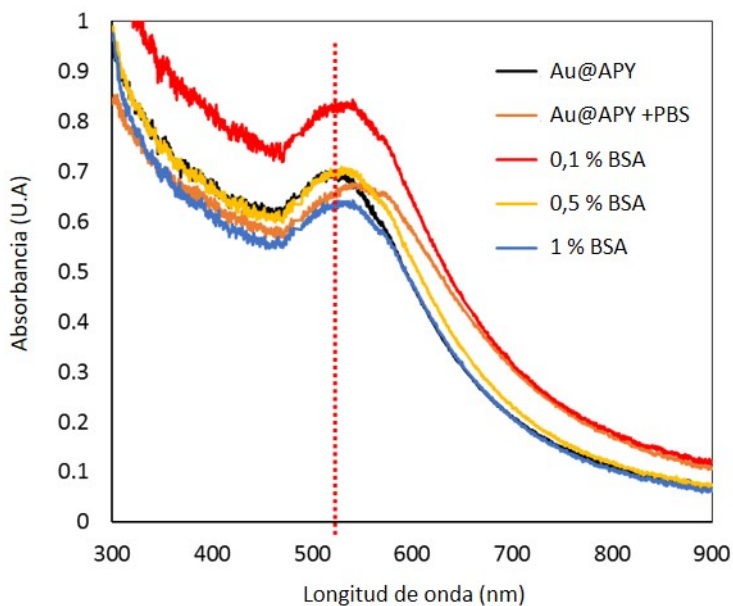


Figura 41. Espectros UV-Vis de las nanopartículas funcionalizadas con BSA a diferentes concentraciones tras haber sido sometidas a un choque iónico. La notación “% BSA” hace referencia al % en p/v de BSA con las que se incubaron las nanopartículas Au@APY previamente al choque iónico con tampón PBS.

Para confirmar que el recubrimiento elegido como óptimo realmente estabilizaba las nanopartículas se registraron micrografías de estas recubiertas con BSA (0,1 % p/v) por TEM. Como se observa en la figura 42, la suspensión es dispersa y no se observan agregados, a diferencia de lo que sucedía con las nanopartículas desnudas (Fig. 42).

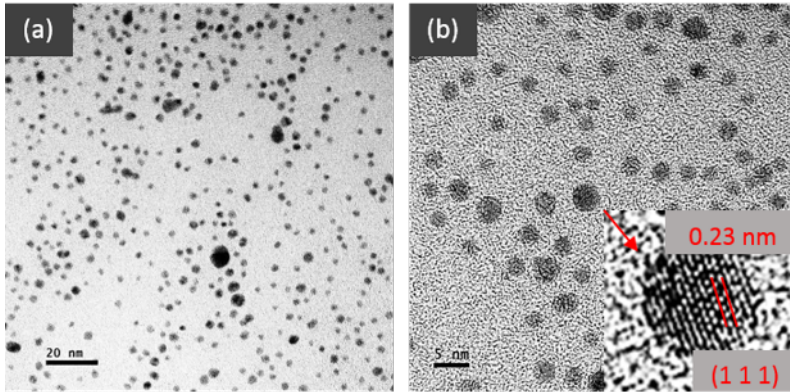


Figura 42. Imágenes TEM de Au@APY recubiertas con BSA a dos magnificaciones diferentes (a y b). En (b) se inserta una imagen de alta resolución en la que se muestran las distancias interplanares que corresponden a los planos (1 1 1) del oro.

Au@APY demuestra propiedades excepcionales en ensayos *in vitro*

Como mencionamos en el capítulo anterior, la posibilidad de formar enlaces amida con los grupos amino de la superficie de la nanopartícula cobra especial interés cuando se trata de conjugar anticuerpos puesto que al favorecer la conjugación predominante por el extremo carboxilo terminal de la fracción constante del anticuerpo nos ofrece una correcta orientación de este, dejando hacia el exterior la zona de reconocimiento del mismo. Por otra parte, el elevado ζ que presenta Au@APY la sitúa como buen candidato a la hora de interactuar con moléculas de DNA, produciendo la condensación de este y permitiendo la transfección del mismo, a la vez que lo protege de la degradación.

- **El Acoplamiento de anti-EGFR a Au@APY de forma dirigida es clave**

Para nuestros ensayos hemos usado un anticuerpo de reconocimiento de EGFR, diana modelo de direccionamiento en cáncer debido a su alta expresión en la superficie celular de muchos tipos tumorales. Nuestro anti-EGFR va marcado con un fluoróforo, Alexafluor-488, para facilitar el rastreo del nanosistema.

El acoplamiento del anti-EGFR a la superficie de Au@APY se realizó como se describe en la sección experimental. La preparación del bioconjugado se basa en la unión covalente entre el anticuerpo y la nanopartícula. La figura 43 muestra la estrategia usada para unir covalentemente el carboxilo terminal de los anticuerpos a los grupos amino de la superficie de las nanopartículas por una reacción mediada por una carbodiimida.

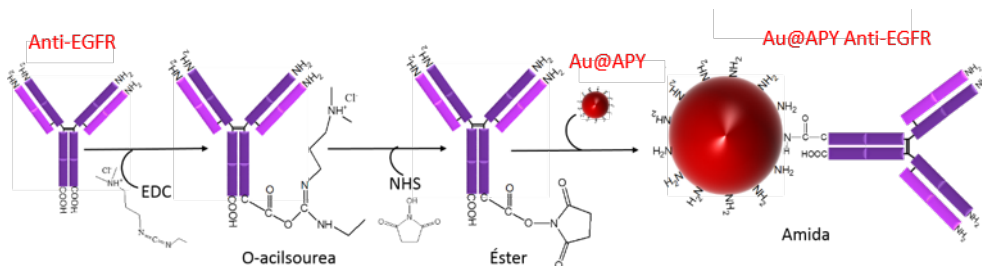


Figura 43. Representación esquemática de la unión covalente de los anti-EGFR a las nanopartículas Au@APY.

En primer lugar una carbodiimida soluble en agua, EDC, activa los carboxilos terminales de los anticuerpos formándose un compuesto intermedio inestable (O-acilsourea). La EDC se utilizó en *tándem* con NHS para mejorar la estabilidad del intermedio de reacción. Una vez activado el anticuerpo se adiciona Au@APY, que reacciona con el intermedio formando un enlace amida con el anticuerpo, quedando este último anclado a la superficie del metal de manera orientada. El proceso se lleva a cabo en presencia de un exceso de anticuerpo para garantizar la máxima funcionalización de las nanopartículas.¹⁰⁷

El conjugado formado es irreversible y muy estable, pudiéndose mantener en frío durante semanas sin aparecer muestras de degradación ni formación de precipitado. Los cambios ópticos de las Au@APY percibidos en el espectro UV-Vis tras la reacción de acoplamiento, indican la unión de los anti-EGFR a la superficie de las mismas; el plasmón se desplaza a mayores longitudes de onda, aproximadamente 30 nm (Fig. 44). Estos cambios ópticos se asocian a diferencias en el índice de refracción local en la superficie de la nanopartícula.¹⁷⁸

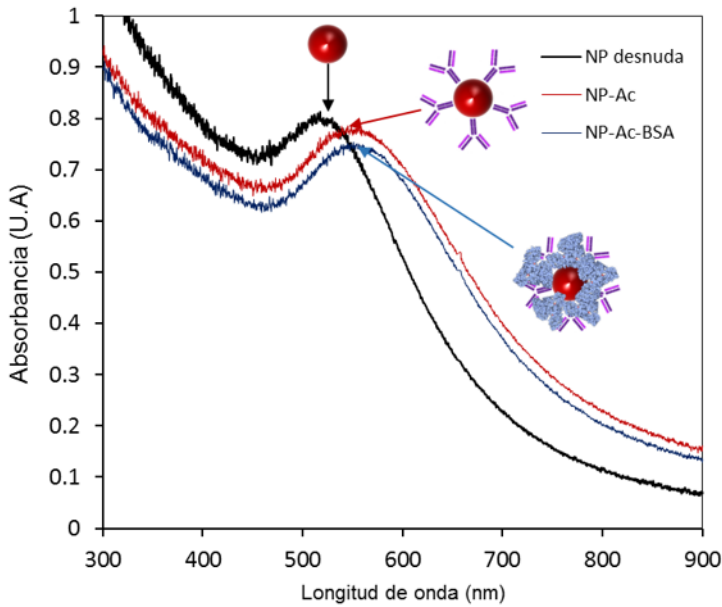


Figura 44. Espectros UV-Vis de la conjugación Au@APY-anti-EGFR, evidenciando un desplazamiento del LSPR tras el acoplamiento del anticuerpo.

Una vez purificado el conjugado nanopartícula-anticuerpo, este se resuspende en una suspensión de BSA al 0,1%, para pasivar la superficie libre evitando interacciones inespecíficas con el entorno biológico en posteriores ensayos.

- **Au@APY no presentan citotoxicidad a las dosis estudiadas**

Para evaluar la posible citotoxicidad del sistema desarrollado se incubaron diferentes líneas celulares, tanto tumorales como no tumorales, con concentraciones crecientes (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de las nanopartículas. Como líneas celulares se usaron fibroblastos dérmicos humanos (HDF) - control modelo de célula no tumoral -, una línea de carcinoma epidermoide (A431) - que sobreexpresa EGFR -, así como células de cáncer de pulmón - donde se evaluará posteriormente la capacidad de transfección de DNA plasmídico por parte del nanosistema -.

Para estimar la citotoxicidad se usó el ensayo AlamarBlue[®], que evalúa la actividad metabólica mediante fluorescencia, siendo esta técnica mucho más sensible que la detección colorimétrica.¹⁹² En este ensayo, la viabilidad se determina por la reducción metabólica llevada a cabo por el cultivo celular del colorante resazurina, de la forma oxidada del colorante (azul) hasta su forma reducida y altamente fluorescente resorufina (rojo). La fluorescencia resultante es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Los resultados mostraron (Fig. 45) que a las concentraciones de trabajo las nanopartículas no son citotóxicas, empezando a denotarse los primeros efectos tóxicos a dosis muy superiores al rango de aplicación.

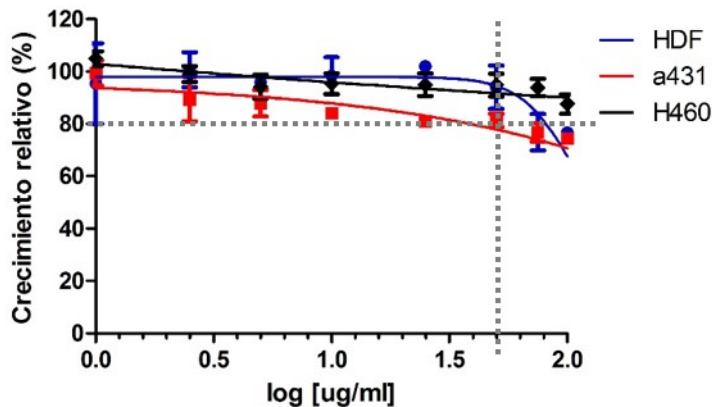


Figura 45. Ensayo de viabilidad AlamarBlue[®] de Au@APY en diferentes líneas celulares. Tiempo de exposición 48 horas a concentraciones crecientes de nanopartículas en el rango 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La línea punteada en gris marca la concentración máxima en todas las líneas celulares estudiadas que no produce efecto tóxico significativo (supervivencia mayor al 80%), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

En general, los nanomateriales que mantienen más del 80% de la viabilidad celular se consideran seguros para su uso en aplicaciones biológicas.¹⁵⁷ Para las líneas celulares estudiadas la supervivencia celular no decae del 80% hasta superado los 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta concentración no será rebasada en ningún momento en los posteriores ensayos de transfección plasmídica, buscando un compromiso entre el posible efecto tóxico y el

beneficio proporcionado por el uso de las nanopartículas como sistema de transfección.

- **Las Au@APY son endocitadas en mayor medida por las células que sobreexpresan EGFR**

La línea celular de carcinoma epidermoide A431 es un reputado modelo de estudio de EGFR debido a la alta expresión que presenta de este receptor.¹⁵³ Antes de abordar el comportamiento de nuestro nanosistema marcado con anti-EGFR, estudiamos la cinética de endocitosis del anticuerpo de reconocimiento mediante microscopía de fluorescencia, gracias a que el anticuerpo está marcado en verde con AlexaFluor 488 (Fig. 46).

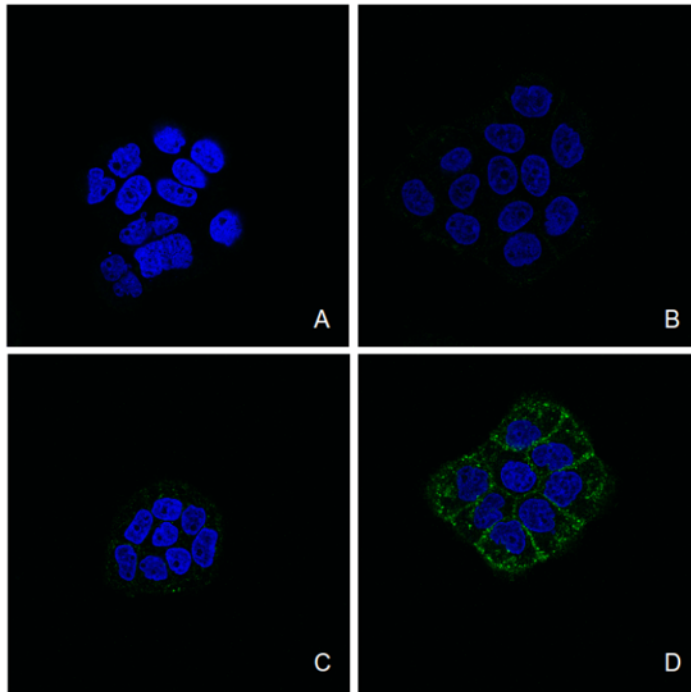


Figura 46. Entrada de anti-EGFR marcado con Alexa Fluor 488 (verde) a diferentes tiempos en la línea celular A431. A) 15 min, B) 60 min, C) 90 min, D) 120 min. Núcleos marcados con Hoechst (azul).

A la vista de los resultados, la cinética de entrada del anti-EGFR por endocitosis mediada por receptor es de unas 2 h (Fig. 46D). Con esta información, evaluamos la capacidad de las células A431 de internalizar Au@APY-anti-EGFR marcado con Alexa Fluor 488 mediante microscopía confocal de fluorescencia (Fig. 47). A las 3 h se observa que las nanopartículas Au@APY dibujan el contorno celular en la misma disposición que el receptor de EGFR en estado nativo, destacándose un inicio de señal en el citoplasma celular que incrementa en periodos de incubación más prolongados. La señal fluorescente en el contorno celular confirma la unión del anti-EGFR a sus receptores diana y, por tanto, la entrada del nanosistema de manera específica.

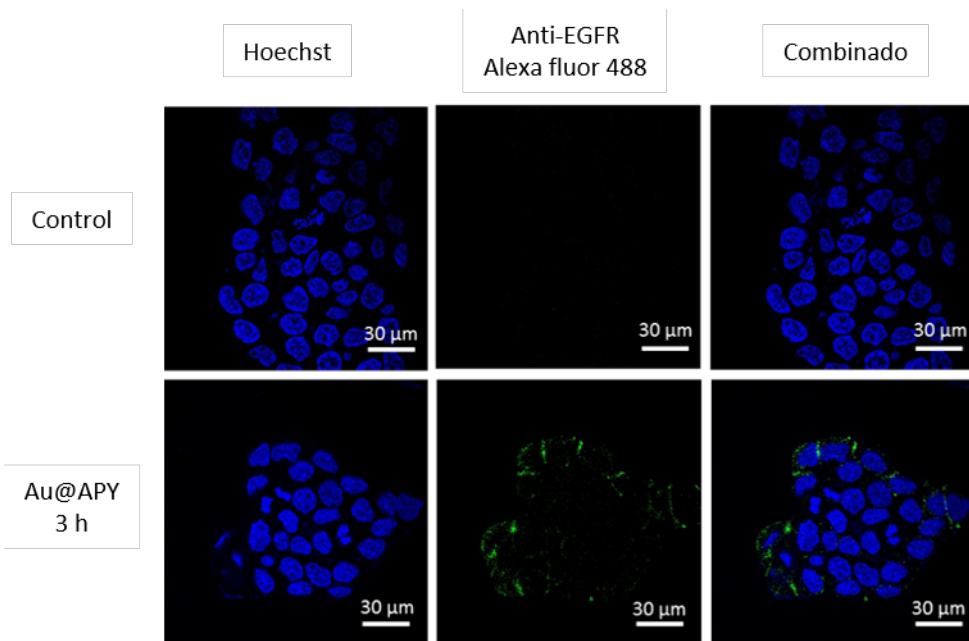


Figura 47. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células A431 incubadas con Au@APY-anti-EGFR a las 3h tras la incubación con Au@APY-aEGFR. Los núcleos teñidos con Hoechst se ven en azul, el anti-EGFR marcado con Alexa flúor 488 en verde.

Los resultados observados en microscopía de campo oscuro se muestran en la figura 48. Como se observa en la imagen, a las 3 h de incubación aparecen acúmulos de nanopartículas refringentes, debido a su

LSPR, en el citoplasma celular. Lo que corrobora los resultados de captación celular obtenidos en microscopía de fluorescencia.

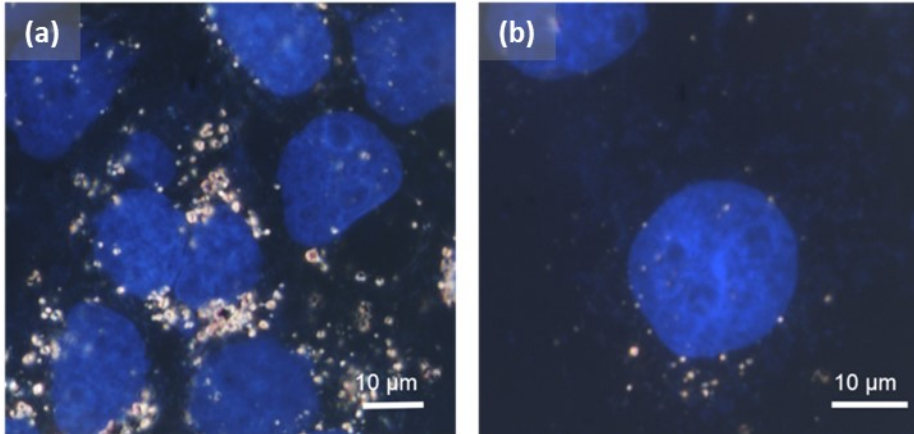


Figura 48. Imágenes de células A431 incubadas con Au@APY tomadas en un microscopio de campo oscuro. Tiempo de ensayo 3 horas. Los núcleos, teñidos con Hoechst, se ven en azul; las nanopartículas en dorado, manifestación de su plasmón de superficie. Las imágenes a y b corresponden a la misma muestra, siendo b el detalle de una célula aislada y sin agregados grandes de nanopartículas.

Las imágenes confirman la posible aplicación de Au@APY en el direccionamiento selectivo de fármacos hacia células cancerígenas con sobreexpresión de EGFR. Esto evitaría la toxicidad sistémica provocada por la quimioterapia actual. Al mismo tiempo, podrían servir como agentes de contraste gracias a los fenómenos ópticos provocados por su plasmón de superficie.

El Sistema Au@APY es idóneo para transfectar y expresar DNA plasmídico

Para estudiar la capacidad transfectiva del sistema Au@APY procedimos a la condensación de un DNA plasmídico modelo, en este caso un plásmido que codifica la proteína GFP (pGFP), con las nanopartículas. La proteína que codifica este plásmido emite fluorescencia, este hecho nos permite no sólo confirmar que se ha producido la transfección, sino también que el plásmido es funcional tras su condensación con las nanopartículas al

poder cuantificarse por técnicas de fluorescencia la cantidad de GFP producida en las células. El proceso de condensación nos permite, por un lado, el paso a través de membranas celulares, es decir la transfección del plásmido al interior celular y, por otro lado, mejora la estabilidad del plásmido frente a la actividad de DNAsas así como otros sistemas naturales de degradación de DNA.

Cabe destacar que las nanopartículas diseñadas, Au@APY, son idóneas para la vectorización de ácidos nucleicos, tanto por su superficie catiónica como por su reducido tamaño. Además, la reducción del tamaño se traduce en un aumento de la superficie específica del material y, por tanto, más cargas positivas disponibles para interactuar frente a lo que sucede con nanopartículas de mayor tamaño.^{184,193}

- **El ensayo de retardo en gel para Au@APY muestra una buena capacidad de carga de DNA**

La electroforesis en gel de agarosa, técnica ampliamente utilizada para analizar DNA en base a su tamaño, permite también establecer si una nanopartícula concreta es capaz de condensar DNA. Para ello, se toma una cantidad fija de DNA y se le añaden cantidades crecientes de nanopartículas, cuando se alcanza la cantidad óptima de nanopartículas, es decir la cantidad necesaria para condensar todo el DNA presente en la muestra, el DNA ya no migra en el gel. En nuestro caso, se mantuvo fija la cantidad de DNA en 500 ng, que se incubaron con concentraciones crecientes de nanopartículas en el rango NP/DNA de 0,5/1 a 10/1 (Fig. 49).

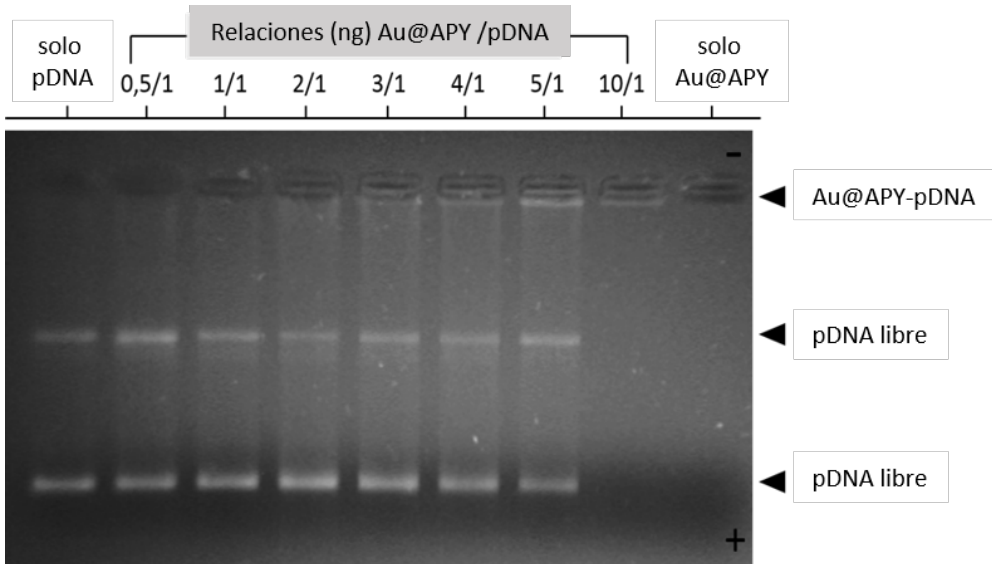


Figura 49. Ensayo de condensación de pDNA por Au@APY. Electroforesis retardada en gel de una cantidad constante de pGFP (500 ng/pocillo) acomplejado con cantidades crecientes de nanopartículas en relación (p/p): 0,5/1; 1/1; 2/1; 3/1; 4/1; 5/1 y 10/1.

Como se observa en la figura 49, la totalidad del DNA es retenido por las nanopartículas cuando se alcanza una proporción 10 a 1 de nanopartículas frente a DNA. Este valor se modificará en siguientes experimentos para alcanzar un compromiso en función del grado de expresión de pGFP y las condiciones óptimas de cultivo.

- **El sistema de transfección optimizado, basado en Au@APY, no presenta citotoxicidad**

Dos de los métodos más extendidos para la transfección de DNA son la lipofección y el uso de polímeros catiónicos como la Polietilenimina (PEI), capaz de formar condensados de DNA gracias a las cargas positivas que presenta. Si bien, la mayor limitación del uso de estos agentes de transfección es su elevada toxicidad, hecho que restringe su uso en organismos superiores.

Como hemos demostrado en apartados anteriores, el sistema Au@APY es capaz de condensar de manera satisfactoria el DNA, demostrando escasa o nula citotoxicidad a las dosis ensayadas. No obstante, estas nanopartículas

carecen, una vez formado el conjugado con el DNA condensando, de un recubrimiento externo que permita la correcta transfección del plásmido deseado en las células. De acuerdo con esto, desarrollamos una metodología que combinara las ventajas de las nanopartículas Au@APY y la capacidad contrastada del PEI para transfectar de manera eficiente material génico, eliminando los posibles efectos citotóxicos que este último presenta. Para ello, incubamos las nanopartículas Au@APY con el DNA plasmídico para seguidamente adicionar PEI y finalizar el proceso con un choque salino de NaCl 150 mM. El sistema resultante, Au@APY/PEI+NaCl, se purifica mediante centrifugación, eliminando el exceso de polímero catiónico y de sales, responsables de su toxicidad.

Si se compara la toxicidad de las nanopartículas Au@APY frente al PEI tras el choque salino (Fig. 50) se observa que el sistema coloidal no presenta toxicidad en las concentraciones de estudio, en cambio el PEI+NaCl presenta una DL_{50} de 13,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

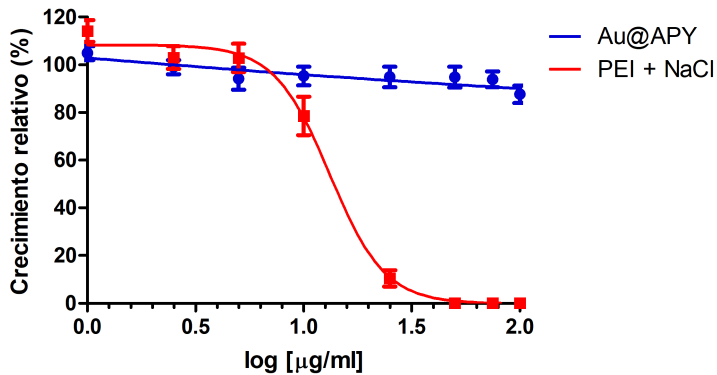


Figura 50. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Au@APY frente al polimérico catiónico PEI+NaCl en la línea celular H460. Tiempo de ensayo 48 h. La DL_{50} del PEI+NaCl es 13,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las nanopartículas no presentan toxicidad significativa en las concentraciones de estudio.

Si evaluamos la toxicidad del sistema Au@APY completo, es decir con el PEI a una concentración de 150mM en NaCl (Au@APY/PEI+NaCl) y

comparamos la toxicidad de este frente al sistema purificado mediante centrifugación, con el que eliminamos el resto de polímero catiónico y sales, la toxicidad desaparece en su totalidad (Fig. 51).

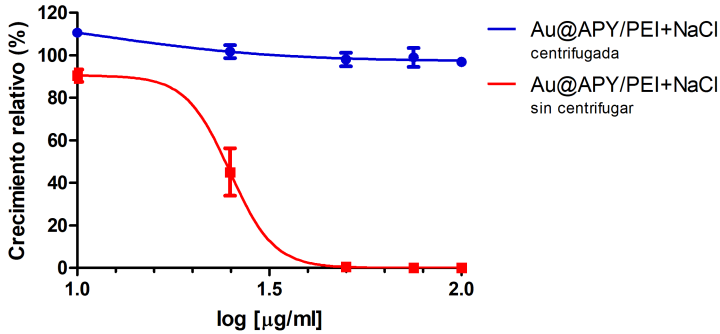


Figura 51. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® del sistema de transfección Au@APY/PEI+NaCl purificado mediante centrifugación (línea azul) y sin purificar (línea roja) en la línea celular H460. Tiempo de ensayo 48 h. La DL₅₀ del sistema sin purificar es de 24,95 µg/mL. El sistema purificado no presenta citotoxicidad a las concentraciones estudiadas.

Además, aun siendo tóxico a las concentraciones ensayadas el sistema Au@APY/PEI+NaCl sin centrifugar, su DL₅₀ (24,95 µg/mL) es prácticamente el doble que la del sistema sin nanopartículas (13,21 µg/mL), por lo que incluso el sistema sin purificar ya ofrece ventajas frente al convencional.

- **La relación expresión de pGFP / toxicidad de nuestro sistema es muy superior a la de los sistemas convencionales**

Para evaluar nuestro sistema se contrastó la eficiencia del método desarrollado con otros descritos en la bibliografía. Por un lado se usó PEI con la ayuda de un choque iónico de NaCl (150 mM) para formar los condensados de DNA plasmídico. Por otro lado se compararon los resultados con un sistema de transfección comercial (lipofectamina XTR, Invitrogen®) ampliamente utilizado para el mismo fin. El rendimiento en la producción de proteína GFP funcional por parte del cultivo celular transfectado se comparó tanto de forma

cualitativa, por microscopía de fluorescencia, como cuantitativa, por citometría de flujo.

En la figura 52 se muestra una representación porcentual del rendimiento de transfección evaluado mediante citometría de flujo, cuantificando la fluorescencia verde generada por la GFP funcional en la línea celular H460. Si bien, los datos revelan que los mayores rendimientos de transfección se obtienen con el polímero catiónico PEI tras choque salino, los resultados de viabilidad demostraron que el sistema es extremadamente tóxico. Algo parecido ocurre con la lipofectamina. Para aumentar el rendimiento de transfección es necesario aumentar la concentración de lípido y, en consecuencia, aumenta también la toxicidad del sistema (Fig. 52).

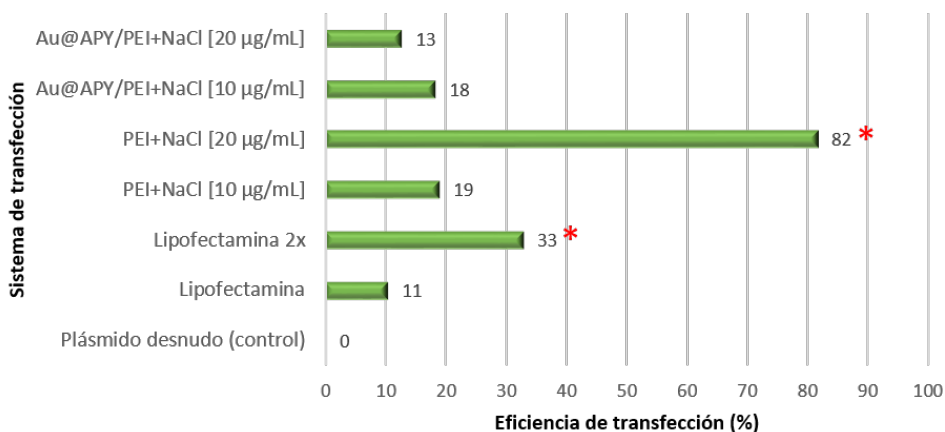


Figura 52. Eficiencia de la transfección de pGFP en la línea celular H460 con diferentes sistemas de transfección. Las concentraciones indicadas hacen referencia a la concentración final del agente de transfección en el medio de cultivo. El asterisco señala las condiciones que produjeron una mortalidad superior a la DL_{50} .

Si bien a una concentración de 10 µg/mL el rendimiento de la transfección es muy similar tanto para el sistema basado en las nanopartículas Au@APY como para el PEI, la viabilidad del cultivo de este último desciende a un 70 %, manteniéndose en el 100% para las nanopartículas. Así mismo, al doble de concentración del sistema de transfección, 20 µg/mL, el rendimiento de transfección de PEI+NaCl aumenta drásticamente, pero la viabilidad del

cultivo no supera el 20% (Fig. 50). Un efecto parecido ocurre cuando usamos el doble de lipofectamina que la recomendada en el kit comercial. Este hecho es fácil de entender si observamos las imágenes de microscopía de los 3 métodos que dieron mayor rendimiento de transfección, es decir, PEI+NaCl, Lipofectamina 2x y Au@APY/PEI+NaCl. Las células muertas se eliminan tras los respectivos lavados previos a la citometría, quedando sólo las células vivas, que expresen o no la proteína GFP y, por tanto, el valor de rendimiento obtenido por citometría de flujo puede ser muy elevado pero no tendrá en cuenta si ha sido a costa de sacrificar un porcentaje elevado de las células debido a la toxicidad del sistema de transfección.

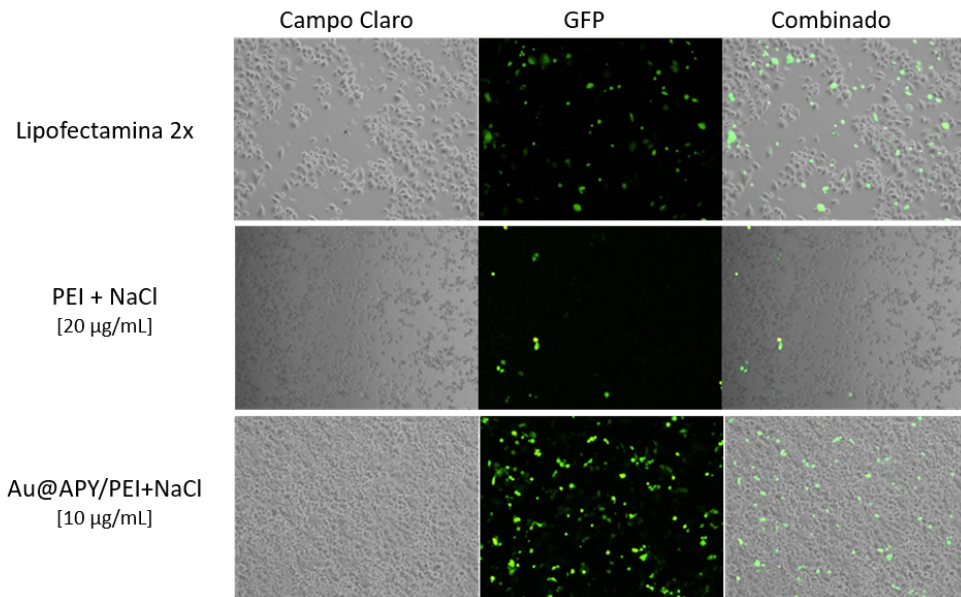


Figura 53. Imágenes de microscopía de campo claro y epifluorescencia de células H460 transfectadas con pGFP por diferentes métodos. Fotografías registradas con un objetivo 10X. Las células se trataron una vez alcanzado el 80% de confluencia, evaluándose la fluorescencia transcurridas 48 h del inicio del tratamiento.

Por tanto, podemos concluir que la carencia de toxicidad de nuestro sistema de transfección lo sitúa como una excepcional alternativa a tener en cuenta frente a otros métodos convencionales para la terapia génica en modelos animales.

Conclusiones

Se ha desarrollado un método de síntesis de AuNPs funcionalizadas con derivados aminotiolados de pirimidina, que dota al nanosistema de cargas positivas. La metodología empleada se realiza *in situ*, en un corto período de tiempo y con alto rendimiento (77 %), a diferencia de otros métodos descritos, los cuales requieren diferentes etapas, mayor tiempo de elaboración y varios cambios de disolvente.

El análisis físico-químico muestra que las nanopartículas obtenidas presentan baja polidispersión y reducido tamaño (~5 nm). Asimismo, el sistema Au@APY demuestra elevada estabilidad coloidal en medio acuoso en un amplio rango de pH, gracias a su elevado ζ (60 mV).

Los grupos amino en superficie nos han permitido acoplar mediante enlace covalente, un anticuerpo dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico. El conjugado NP-Ab ha demostrado su capacidad de atravesar la membrana celular de manera dirigida en una línea celular con sobreexpresión de dicho receptor.

La exposición de cultivos celulares a grandes concentraciones de Au@APY no presenta efectos tóxicos significativos. Este hecho, unido a las propiedades ópticas ligadas al plasmón de superficie y a la selectividad de la vectorización mediada por anticuerpos constituye a Au@APY en un excepcional candidato en futuros ensayos como agente teragnóstico.

La presencia de grupos amino en la superficie de las nanopartículas las convierte en una potente herramienta para la terapia génica del cáncer, ya que permiten unir y compactar ácidos nucleicos mediante interacción electrostática. Utilizando un sistema basado en estas nanopartículas se ha logrado transfectar un plásmido que, tras su internalización en la célula, ha demostrado ser funcional. Nuestro sistema de transfección presenta la ventaja, sobre los habitualmente utilizados, de poseer una baja toxicidad, lo que lo hace un firme candidato para ensayos de terapia génica en organismos superiores.

Capítulo 4.
Nanopartículas de plata
funcionalizadas con 4,6-diamino-2-
mercaptopirimidina
Evaluación como agente
antitumoral selectivo

Resumen

El uso de las nanopartículas de plata como antiséptico está muy extendido debido a su capacidad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antiparasitaria. No obstante, actualmente su uso está en entredicho por los demostrados efectos tóxicos que pueden acarrear en el organismo. Si bien, esta capacidad citotóxica puede ser de gran utilidad en la terapia del cáncer si se consigue dirigir estas nanopartículas, de manera específica, a células tumorales.

Por otro lado, el anillo de pirimidina es un importante componente de los ácidos nucleicos que se encuentra también en numerosas moléculas que presentan actividad antiviral, anticancerígena, antibacteriana y antifúngica. Específicamente, muchos derivados de la 2-mercaptopirimidina son capaces de inhibir la síntesis de RNA de transferencia lo que los convierte en prometedores agentes quimioterapéuticos.

Como se describe en este capítulo, en esta tesis se han sintetizado satisfactoriamente nanopartículas de plata funcionalizadas con un derivado de la 2-mercaptopirimidina, el 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina. Así mismo, se aprovechó la alta densidad de grupos amino que estas nanopartículas presentan en superficie para anclar de manera orientada un anticuerpo extensamente usado como agente de direccionamiento tumoral. Finalmente, se evaluó, tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad citotóxica del nanosistema para la terapia selectiva contra el cáncer en aquellas células que presentan una sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Antecedentes

El uso de la plata con fines terapéuticos está extendido desde tiempos inmemoriales. Ya en la antigüedad era popular su uso para la desinfección de aguas, introduciéndose a finales del siglo XIX la prescripción de nitrato de plata en suspensión acuosa indicado en oftalmia neonatal.¹⁹⁴ En la década de 1920, la FDA aprobó el uso de disoluciones de plata iónica como agentes antibacterianos. El uso de la plata como desinfectante sigue vigente hoy día, llegando incluso a estar presente como sistema de purificación de agua en la nave espacial Apolo o en la propia estación espacial MIR.¹⁹⁵

El uso terapéutico de la plata en forma de nanopartículas no llegó hasta 1897, año en el cual se comercializa un producto con aplicaciones médicas, basado en una suspensión coloidal de AgNPs de un tamaño promedio de 10 nm y que recibía el nombre de *Collargol*. Las distintas formulaciones basadas en AgNPs indicadas en el tratamiento de heridas crónicas, úlceras y quemaduras se fueron popularizando como alternativa al nitrato de plata debido a los efectos secundarios que este último presentaba (irritación, naturaleza cáustica, ennegrecimiento de la piel y desequilibrio electrolítico).¹⁹⁵ Hoy día, podemos encontrar AgNPs en vendajes, apósitos, pomadas, ropa o incluso en electrodomésticos, con el fin de evitar la proliferación de microorganismos patógenos gracias a su demostrada actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antiparasitaria.¹⁹⁶

En las últimas décadas, el foco de interés sobre las AgNPs ha recaído en las excepcionales propiedades ópticas asociadas al plasmón de superficie que estas nanopartículas presentan. En la actualidad, las AgNPs juegan un papel protagonista en el desarrollo de sensores y técnicas diagnósticas basadas en resonancia plasmónica, ya que son mucho más sensibles que las técnicas convencionales.¹⁹⁷ Estos avances han incrementado el interés del uso de las AgNPs en el área de la biomedicina para el desarrollo de nuevos nanosistemas teragnósticos, es decir, aquellos nanosistemas con funciones duales tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de enfermedades, más allá de su propiedades antisépticas.

Este creciente interés en las AgNPs ha llevado a investigadores de todo el mundo a intensificar los estudios sobre su biocompatibilidad, quedando reflejado en multitud de trabajos los efectos nocivos que presentan las AgNPs en el organismo. En este sentido, si bien son conocidos sus efectos tóxicos en

diferentes tejidos,¹⁹⁸ aún no se han discernido los mecanismos concretos por los que se desarrolla esta toxicidad. Lo que sí se considera común en todas las variantes de efectos tóxicos que presentan las AgNPs es su comportamiento similar a un “caballo de Troya”. De esta forma, el nanosistema entra en las células mediante procesos de internalización inespecíficos como la fagocitosis, que permite el transporte de estas nanopartículas hasta el citoplasma celular por vía lisosómica. El ambiente ácido de estos compartimentos favorece la liberación de iones Ag^+ , responsables de la generación de ROS que afecta a diferentes orgánulos y biomoléculas, como los lípidos de membrana, la cadena respiratoria o incluso al DNA. Todos estos efectos llevan, en última instancia, a la muerte celular.^{64,199} Por otra parte, los efectos tóxicos van a depender no sólo de la propia naturaleza de la plata, sino también del tamaño y la forma que presente el nanosistema, su estabilidad en el medio, su reactividad superficial o las moléculas presentes en su superficie. Este hecho, hace necesaria la evaluación toxicológica individualizada para cada sistema de AgNPs desarrollado y en función de la aplicación a la que vayan destinados.

La toxicidad de la plata, que *a priori* puede entenderse como un efecto nocivo, puede también llegar a ser una herramienta útil en la lucha contra ciertas patologías, siendo particularmente relevante en el caso del cáncer. Para ello, es indispensable vectorizar las AgNPs a las células tumorales (que presentan de forma intrínseca altos niveles de ROS), evitando su entrada en células sanas. Además, la capacidad de transportar agentes activos, así como las propiedades ópticas debidas al plasmón de superficie de las AgNPs, las sitúa como posibles agentes teragnósticos en el tratamiento selectivo de tumores.

El anillo de pirimidina es un importante componente de los ácidos nucleicos que puede también encontrarse en numerosas moléculas que presentan actividad antiviral, anticancerígena, antibacteriana y antifúngica.^{170,171} Específicamente, muchos derivados de la 2-mercaptopirimidina son capaces de inhibir la síntesis de RNA de transferencia lo cual los hace prometedores agentes quimioterapéuticos.¹⁷²

A pesar del interés de las nanopartículas metálicas como vectores de liberación, así como de los derivados de mercaptopirimidina por su acción antitumoral, la síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con 2-mercaptopirimidina no se ha descrito todavía.

A lo largo de este capítulo se desarrollará un método sencillo, a la vez que preciso, para obtener nanopartículas de plata funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina (APY) como derivado de 2-mercaptopyrimidina. Seguidamente, se usaran los grupos amino libres disponibles en la superficie del nanosistema para anclar de manera direccionada un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR), ya que, como se mencionó en capítulos anteriores, el EGFR es actualmente una de las principales dianas en la terapia antitumoral.¹⁵³ Nuestro objetivo final consistirá en evaluar si este nuevo nanosistema produce un efecto citotóxico selectivo tanto en células tumorales que sobreexpresen epítopos de reconocimiento específicos y si su citotoxicidad conduce a la remisión de tumores en un modelo murino de cáncer de mama en ratonas BALB/c.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de AgNPs funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina (Ag@APY)

Para llevar a cabo la síntesis de AgNPs con el derivado orgánico APY aprovechamos la experiencia adquirida en los Capítulos 2 y 3, donde se abordó el desarrollo de un método general de síntesis de AgNPs con derivados tiolados de cadena corta y la extensión de esta metodología modificando la sal metálica y el ligando orgánico para obtener nanopartículas de oro (AuNPs). Al igual que ocurre en el capítulo 3 para el caso de Au@APY, las AgNPs funcionalizadas con APY se sintetizaron en DMF, agitación vigorosa y en una relación molar [plata : ligando orgánico] de [0,5:1] para obtener el nanosistema Ag@APY. Los detalles de la síntesis se describen en la sección de Materiales y Métodos.

Una vez sintetizada Ag@APY, se corroboró si la morfología de las nanopartículas desarrolladas era similar a su homólogo de oro mediante TEM. Como se observa en la figura 54, las nanopartículas Ag@APY son esféricas y cristalinas, como muestra el patrón de difracción insertado en la figura. La distribución del tamaño de partícula es estrecha, siendo su diámetro medio de 4-5 nm.

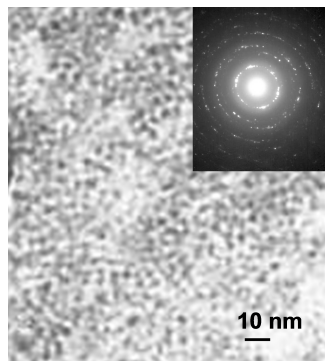


Figura 54. Micrografía TEM de las nanopartículas Ag@APY y patrón de difracción (entrada).

Para comprobar si Ag@APY estaba correctamente funcionalizado en superficie con el derivado APY, estudiamos el nanosistema mediante espectroscopía FTIR. La comparación entre el espectro de FTIR del sistema coloidal Ag@APY y el propio APY demuestra claramente que la funcionalización de la superficie de la nanopartícula con el derivado APY se ha realizado de manera correcta durante la reacción de síntesis (Fig. 55). El espectro de APY se corresponde con dos formas tautoméricas (Fig. 55 – esquema inserto) siendo, de acuerdo con los datos del espectro, mayoritario el tautómero 2. Como se esperaba, las vibraciones del tautómero 2 de APY a 1742 cm^{-1} (δ_{NH}) y a 1330 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=S}}$) desaparecen en la nanopartícula, ya que el único tautómero presente en este caso es el tautómero 1, y el APY que no ha reaccionado ha sido eliminado durante el proceso de purificación del nanosistema. Así mismo, la vibración del grupo tiol en el tautómero 1 a 2646 cm^{-1} ($\nu_{\text{S-H}}$) también desaparece en Ag@APY debido a la formación del enlace metal-azufre.

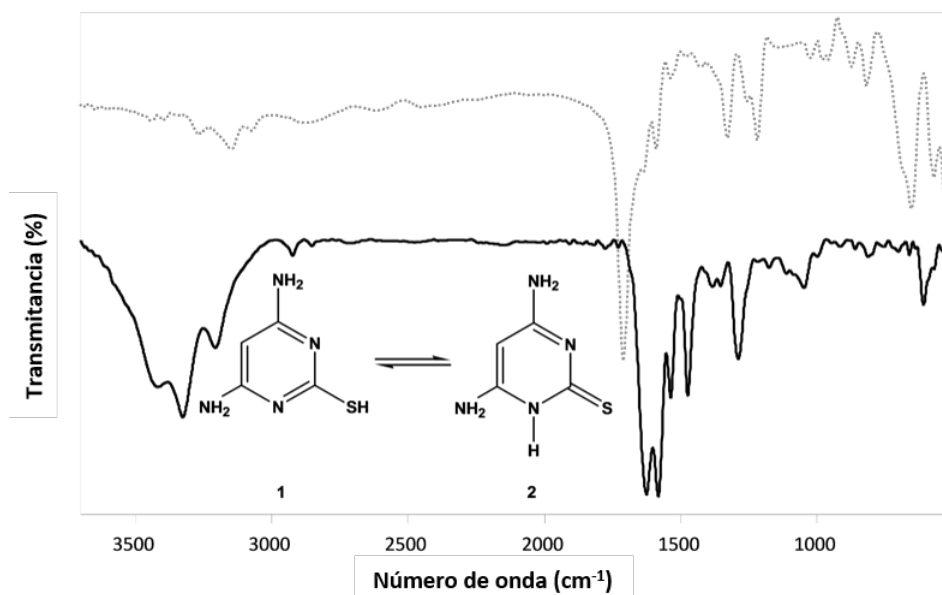


Figura 55. Espectro FTIR de APY (línea de puntos gris) y Ag@APY (línea negra sólida). Imagen inserta: tautomería que presenta el derivado orgánico APY con el que se funcionaliza la superficie de las nanopartículas Ag@APY.

En cuanto a la estabilidad hidrodinámica se refiere, las Ag@APY son extremadamente estables en medio acuoso, como evidencia su elevado ζ , +46,61 mV. Es también notable que el signo positivo del ζ es el esperado para estas nanopartículas, cuya superficie está altamente decorada con grupos amino en superficie cargados a pH 7.

Funcionalización con anti-EGFR mediada por carbodiimidas

Las nanopartículas Ag@APY fueron funcionalizadas con anti-EGFR, utilizando la metodología descrita en los capítulos anteriores, esto es, mediante una reacción de acoplamiento mediada por una carbodiimida. La figura 56 muestra, de forma esquemática, la estrategia usada para anclar covalentemente el anticuerpo por su extremo carboxilo terminal al grupo amino de la superficie funcional del nanosistema Ag@APY. Para la reacción de acoplamiento usamos en tándem una carbodiimida soluble en agua, EDC, y NHS este último con objeto de mejorar la estabilidad en agua del intermedio activado del ácido carboxílico. Además, se usó un exceso de anticuerpo para garantizar el máximo revestimiento de las nanopartículas.

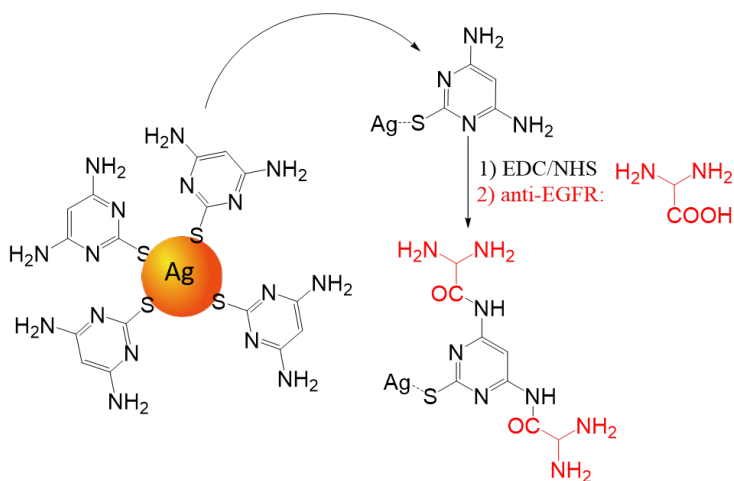


Figura 56. Representación esquemática de la reacción de acoplamiento de anti-EGFR a Ag@APY, mediada por carbodiimida.

Para corroborar si el anticuerpo se había unido a las nanopartículas rastreamos su plasmón superficial mediante espectroscopía UV-Vis antes de la reacción de acoplamiento y después del acoplamiento con anti-EGFR. El espectro del nanosistema acoplado al agente de direccionamiento se determinó después de un proceso de purificación por centrifugación, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. La figura 57 muestra el espectro de UV-Vis de Ag@APY (máximo del plasmón de superficie a 442 nm) y el de las nanopartículas funcionalizadas con antiEGFR, de ahora en adelante Ag@APY-aEGFR (máximo del plasmón de superficie a 430nm). El desplazamiento observado del máximo del plasmón, antes y después de la funcionalización con el anticuerpo, indicó que se había producido el anclaje de este último a la superficie de la nanopartícula. Además, el desplazamiento a longitudes de onda menores que presenta Ag@APY-aEGFR con respecto a Ag@APY podría interpretarse como un aumento de la estabilidad en medio acuoso, debido a la mayor separación entre las nanopartículas cuando se encuentran funcionalizadas con el anticuerpo donde tiene lugar, además de la estabilización por repulsión de cargas debida a las moléculas de APY en superficie, una estabilización por impedimento estérico entre las biomoléculas de anticuerpo. Por otra parte, el pico de absorción que muestra Ag@APY-aEGFR a 280 nm se corresponde con la absorbancia característica de las proteínas, evidenciando, por tanto, la presencia del anticuerpo en la superficie del nanosistema.

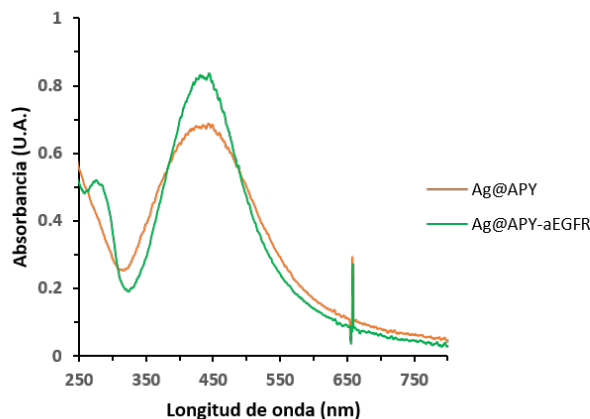


Figura 57. Espectro de UV-Vis de Ag@APY (línea dorada) y Ag@APY-aEGFR (línea verde).

Los resultados obtenidos para la síntesis y caracterización del nanosistema Ag@APY muestran un sistema coloidal estable, altamente funcionalizado, de pequeño tamaño y capaz de anclar en superficie anticuerpos de reconocimiento mediante acoplamiento por carbodiimidas.

La citotoxicidad de Ag@APY varía en función del tipo celular, agente de recubrimiento, así como de su direccionamiento a EGFR

Con el propósito de estimar la actividad de las nanopartículas desarrolladas en modelos celulares, se realizó un primer ensayo de viabilidad para valorar el rango de citotoxicidad de las nanopartículas Ag@APY y si estos efectos se veían modificados en función del tipo de recubrimiento que presentara el nanosistema. Este primer experimento persigue determinar, por un lado, el rango de nanopartículas en el que debemos realizar el estudio comparativo y, por el otro, identificar qué agentes son los más adecuados para disminuir las posibles interacciones inespecíficas de biomoléculas con la superficie de las nanopartículas durante los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para ello, incubamos las células con concentraciones crecientes de nanopartículas en el rango 1 µg/mL hasta los 100 µg/mL tanto desnudas, es decir, sin agente de recubrimiento, como con BSA y PEG. Para llevar a cabo el recubrimiento de Ag@APY se incubaron las nanopartículas con suspensiones acuosas de BSA o PEG al 0,1% p/v y se mantuvieron en agitación suave durante dos horas para obtener, respectivamente, Ag@APY+BSA y Ag@APY+PEG. Ambos recubrimientos son de uso común en el campo de la biomedicina por su biocompatibilidad y porque ambos poseen una reconocida capacidad para pasivar la reactividad inespecífica de la superficie de las nanopartículas. Además, PEG es especialmente interesante ya que es capaz de evitar el reconocimiento por macrófagos, entre otros sistemas de defensa del organismo. La incubación de las células con las diferentes nanopartículas se mantuvo durante 48 h, registrándose la viabilidad celular mediante fluorescencia por la técnica AlamarBlue® (Fig. 58).

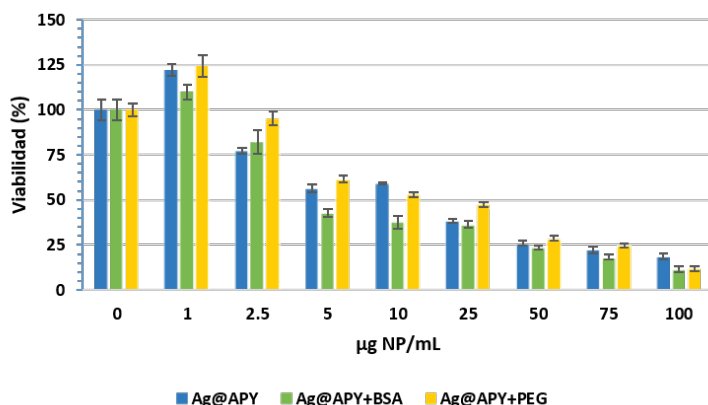


Figura 58. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Ag@APY con diferentes recubrimientos (BSA y PEG) sobre la línea celular A431 transcurridas 48 h. Las células expuestas a concentración 0 reciben la máxima concentración de medio de cultivo sirviendo como control. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

A la vista de los resultados, las nanopartículas recubiertas con BSA (Ag@APY+BSA) son ligeramente más citotóxicas, a concentraciones intermedias (5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que las Ag@APY sin recubrir. En cambio, el recubrimiento con PEG (Ag@APY+PEG) presenta una ligera disminución de la citotoxicidad frente a las nanopartículas desnudas. Debido a estos resultados, decidimos continuar los siguientes ensayos en modelos celulares y animales usando, como paso previo a la inoculación de las nanopartículas, el recubrimiento del nanosistema con PEG. De ahora en adelante, y para simplificar la nomenclatura, nos referiremos a Ag@APY+PEG como Ag@APY. Esta elección obedece al hecho de que en los ensayos *in vivo* preferimos optar por una menor citotoxicidad, aunque en última instancia el fármaco se vectorice, para minimizar posibles efectos secundarios adversos. Además la pegilación camufla las nanopartículas frente al ataque de nuestro sistema inmune, aumentando su vida media. El siguiente paso en nuestra investigación se centró en el estudio de la actividad citotóxica de las Ag@APY con el propósito de usarlas como agente antitumoral *per sé* en aquellas células tumorales que sobreexpresan EGFR. Para ello, seleccionamos diferentes líneas celulares procedentes de distintos tejidos y que poseían distintos niveles de expresión de este receptor:

- **A431.** Línea celular modelo de carcinoma epidermoide humano usada en estudios del ciclo celular y cáncer asociado a rutas de señalización y que presenta niveles anormalmente altos de EGFR.
- **HDF.** Fibroblasto de la dermis humano que usaremos como modelo de célula epidérmica no tumoral.
- **MCF7.** Se trata de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano hormonodependiente al presentar positividad para receptores de estrógenos y progesterona.
- **MDA-MB-231.** Células de adenocarcinoma de mama humano hormono-independientes.
- **4T1.** Línea celular de cáncer de mama de ratón que usaremos para el modelo de cáncer de mama en ratonas BALB/c.

Para determinar el grado de expresión relativa de EGFR en estas líneas celulares, cuantificamos mediante citometría de flujo la expresión del receptor otorgándole el valor de 100% a la línea celular modelo de expresión de EGFR, es decir, las células A431 (Fig. 59).

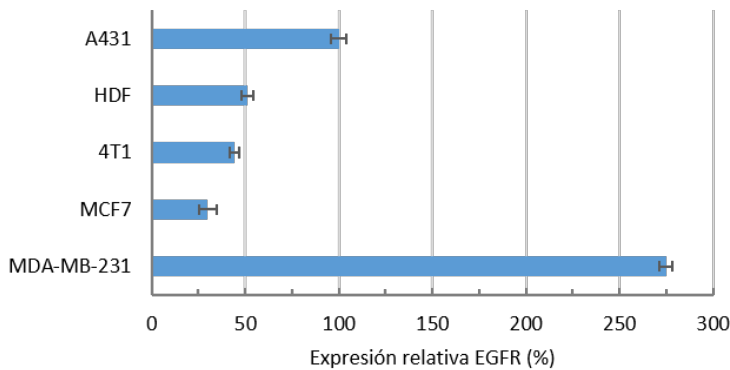


Figura 59. Expresión relativa del receptor EGF en diferentes líneas celulares siendo 100% el valor de expresión de EGFR en la línea celular A431.

Si observamos los resultados, las líneas celulares HDF y 4T1 sobreexpresan aproximadamente la mitad de receptores que A431. A su vez, de todas las líneas celulares analizadas MCF7 es la que menos EGFR expresa, siendo aproximadamente cuatro veces inferior a la expresión en A31. Sorprendentemente, las células MDA-MB-231 destacan por presentar un número de receptores tres veces superior al que encontramos en A431, que es la línea modelo usada en la bibliografía para estudios celulares dirigidos a este receptor.

A continuación, se evaluó la citotoxicidad dirigida del sistema Ag@APY-aEGFR en cuatro líneas celulares: Los dos tipos celulares de piel, carcinoma epidermoide (A431) frente al control sano de tejido (HDF), y las dos líneas celulares de cáncer de mama humano (MDA-MB-231 y MCF7). Como se ha demostrado previamente, estos tejidos presentan diferente grado de expresión del EGFR, siendo éste mucho más elevado en las líneas celulares A431 y MDA-MB-231. En este ensayo se ha evaluado de manera individual, para cada tipo celular, cómo afecta en la viabilidad del cultivo la presencia del agente de direccionamiento, es decir, se ha comprobado la actividad de Ag@APY con la de Ag@APY-aEGFR (Fig. 60).

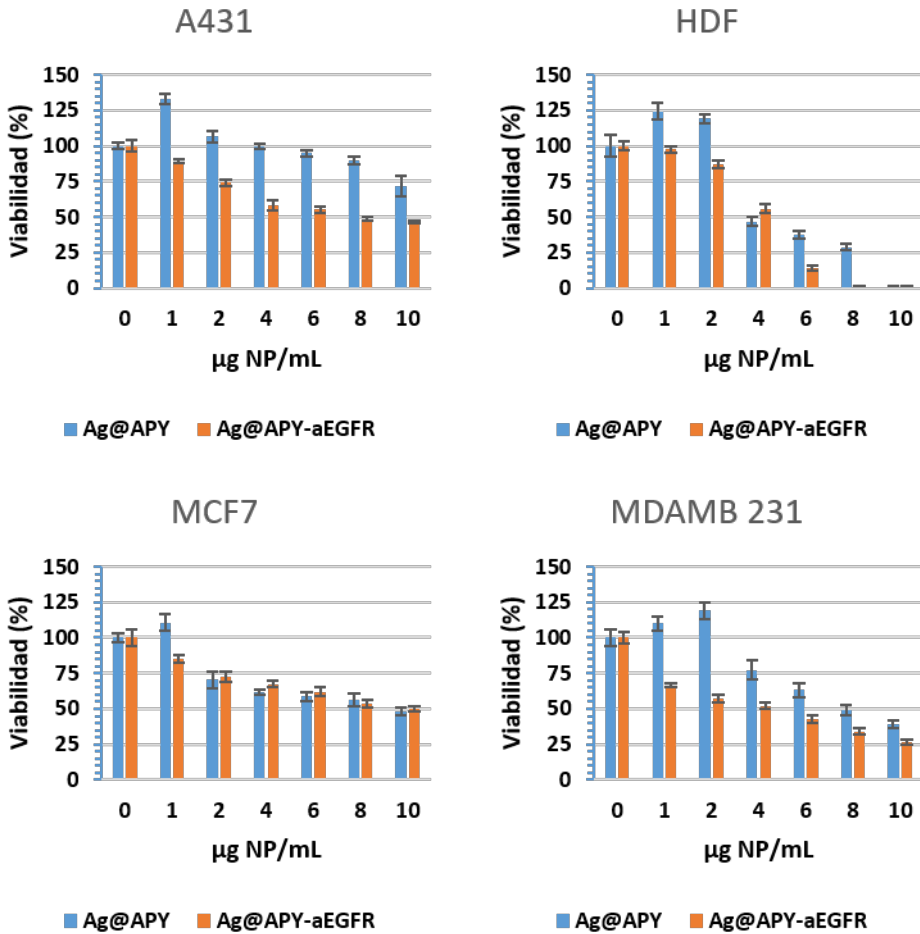


Figura 60. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Ag@APY y Ag@APY-aEGFR sobre las líneas celulares A431, HDF, MCF7 y MDA-MB-231 transcurridas 48 h del inicio de la exposición. Las células expuestas a concentración 0 constituyen el control. Los valores representan la media ± error estándar de la media (n=3).

A la vista de los resultados mostrados en la Figura 60, la presencia de anti-EGFR en la nanopartícula disminuye la viabilidad de las células de manera significativa para todos los cultivos celulares frente a la nanopartícula en ausencia de agente de vectorización. Si bien, en la línea celular MCF7, que presenta los menores niveles de expresión de EGFR, no se observan diferencias estadísticamente significativas con el incremento de la dosis en las nanopartículas con anticuerpo de direccionamiento. Este hecho se debe,

probablemente, a que la entrada mediada por receptor es más rápida que la inespecífica y, por tanto, las nanopartículas comienzan a ejercer su efecto citotóxico antes cuando se vectorizan. Por otro lado, es interesante observar que a dosis bajas de nanopartículas (1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la presencia del anticuerpo en el nanosistema evita la inducción del crecimiento celular que presentan las nanopartículas en ausencia de anticuerpo (1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El aumento en el crecimiento celular a dosis bajas de nanosistemas es un hecho generalizado, que se justifica porque la célula pone en marcha su maquinaria metabólica para defenderse de la agresión que supone la internalización de un nanosistema. Este aumento en el metabolismo se traduce en un aumento de la viabilidad, debido a la propia naturaleza del ensayo AlamarBlue®. En cambio, en el caso de las nanopartículas vectorizadas, Ag@APY-aEGFR, esto no se observa porque su entrada en la célula es rápida (la entrada mediada por receptor suele producirse en las dos primeras horas tras la incubación) y el efecto tóxico de las nanopartículas comienza a manifestarse muy rápido impidiendo la compensación metabólica.

En la figura 61 se ha representado en una única gráfica la viabilidad de las cuatro líneas celulares ensayadas frente a la exposición a Ag@APY-aEGFR. Como se observa en la figura, a dosis bajas de nanopartículas (1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) el sistema Ag@APY-aEGFR es menos tóxico para HDF que para el resto de líneas celulares, si bien, conforme aumentamos la dosis, la toxicidad aumenta de manera drástica en comparación a la que presentan el resto de cultivos, no apareciendo células viables a dosis superiores a los 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este hecho podría deberse a que, como es sabido, las líneas tumorales tienen una mayor tolerancia al estrés oxidativo (que es uno de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas de plata) que las no tumorales. Por ello, aunque la maquinaria celular de defensa de HDF sea capaz de hacer frente al estrés a dosis bajas, esta capacidad decae rápidamente comparada con la de las líneas tumorales. En cuanto a las líneas tumorales la más afectada es, como cabía esperar, la que posee un mayor nivel de expresión de EGFR, MDA-MB-231, cuya dosis letal 50 es la mitad de las de las otras dos líneas.

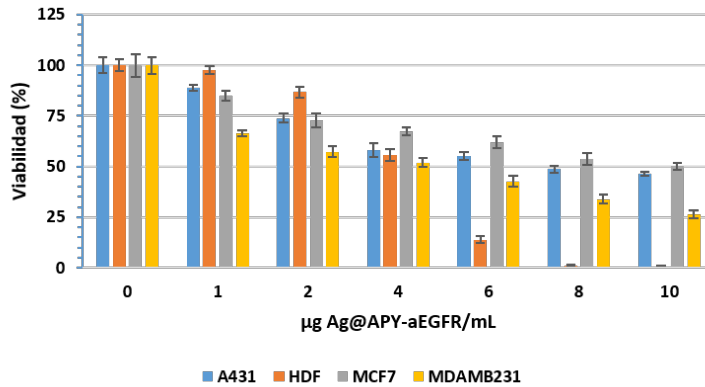


Figura 61. Ensayo de viabilidad AlamarBlue® de Ag@APY-aEGFR sobre las líneas celulares A431, HDF, MCF7 y MDA-MB-231 transcurridas 48 h del inicio de la exposición. Las células expuestas a concentración 0 reciben la máxima concentración de medio de cultivo sirviendo como control. Los valores representan la media ± error estándar de la media (n=3).

A continuación se estudiaron los posibles efectos que provocaba la exposición de las células a las nanopartículas Ag@APY-aEGFR en su morfología. Para ello, incubamos células A431 con 10 µg/mL (concentración ligeramente superior a la DL₅₀) de Ag@APY-aEGFR. Transcurridas 2 h del inicio de la exposición (tiempo en el que es efectiva la entrada en la célula mediada por receptor), retiramos el medio de cultivo y lavamos varias veces con PBS 1X para eliminar los nanosistemas que no se hubieran unido al receptor y/o se hubieran internalizado gracias a él, con el propósito de minimizar posibles interferencias por entrada inespecífica de las nanopartículas. Finalmente, se mantuvieron las células en condiciones de crecimiento durante 48 h.

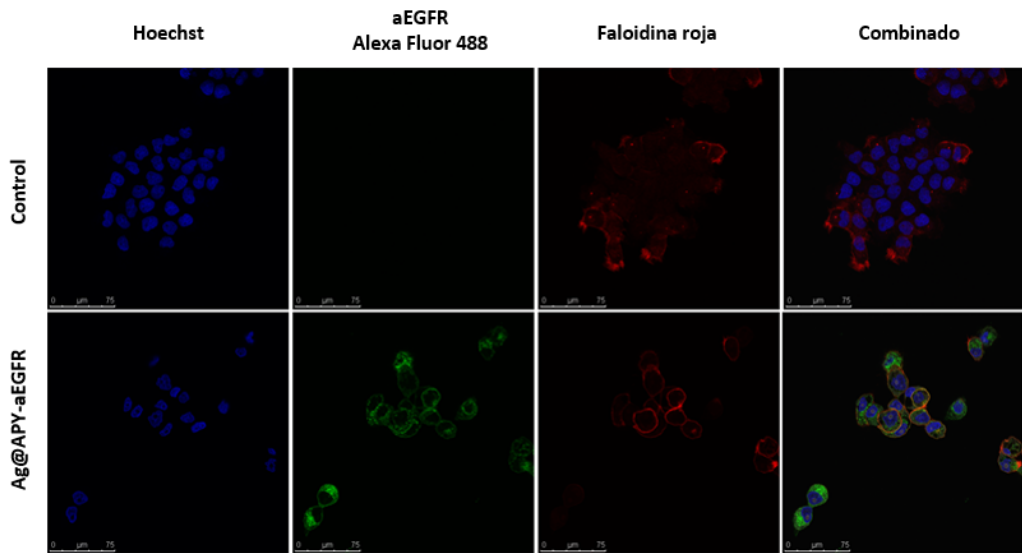


Figura 62. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el efecto de la exposición a Ag@APY-aEGFR (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la línea celular A431. Núcleos teñidos con Hoechst (canal azul), actina teñida con faloidina roja (canal rojo) y anti-EGFR con Alexa Fluor 488 (canal verde). Se utilizan como control células A431 sin exponer a las nanopartículas.

Como se observa en la figura 62 tras el tratamiento con las nanopartículas Ag@APY-aEGFR, la mayoría de las células se encuentran claramente en una fase de pre-apoptosis, como se concluye por la contracción del núcleo y la despolimerización de la actina. Además, estos resultados muestran que la conjugación del anticuerpo a las nanopartículas se ha completado con éxito y que la actividad biológica del anticuerpo permanece después de la conjugación al nanosistema.

A dosis bajas Ag@APY disminuye el tamaño de los tumores en un modelo murino de cáncer de mama en ratonas BALB/c

Para evaluar la capacidad antiproliferativa de las nanopartículas Ag@APY en tumores, desarrollamos un modelo de cáncer de mama en ratonas BALB/c. Para poner a punto este modelo se inocularon 1×10^6 células de adenocarcinoma de mama de ratón (línea celular 4T1) en el tejido adiposo de

una de las glándulas mamarias posteriores de ratonas BALB/c, obteniéndose tumores que crecieron exponencialmente durante 4-5 semanas (Fig. 63).

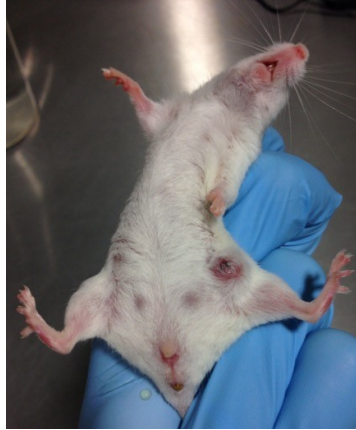


Figura 63. Ratona BALB/c con tumor inducido en la mama inferior izquierda cinco semanas después de la inoculación de las células 4T1.

Posteriormente, se sacrificaron para evitar el sufrimiento de los animales. Después de una necropsia detallada, se incluyeron en parafina los tumores mamarios y algunos órganos (pulmón, hígado, bazo, riñón y corazón). En primer lugar, se procedió a la caracterización de los tumores generados en la glándula mamaria. Se realizaron cortes de 5 μm de las piezas parafinadas y se tiñeron con H&E. Como se observa en la figura 64 los tumores presentaban un índice proliferativo alto, desmoplasia, aspecto poco diferenciado, aumento de la vascularización y, además, la mayoría de los animales desarrollaron metástasis en pulmón. . De hecho, la elección de las células 4T1 de debió a que son un excelente modelo para mimetizar el cáncer de mama humano debido a su elevado índice de metástasis. Además esta línea es originaria de las ratonas BALB/c y, por tanto, se pueden usar estas ratonas como modelo animal en lugar de ratonas *nude*. Esto es importante porque nuestro modelo no tiene comprometido su sistema inmune, ofreciendo una situación más aproximada a la realidad que los modelos que carecen de este sistema.

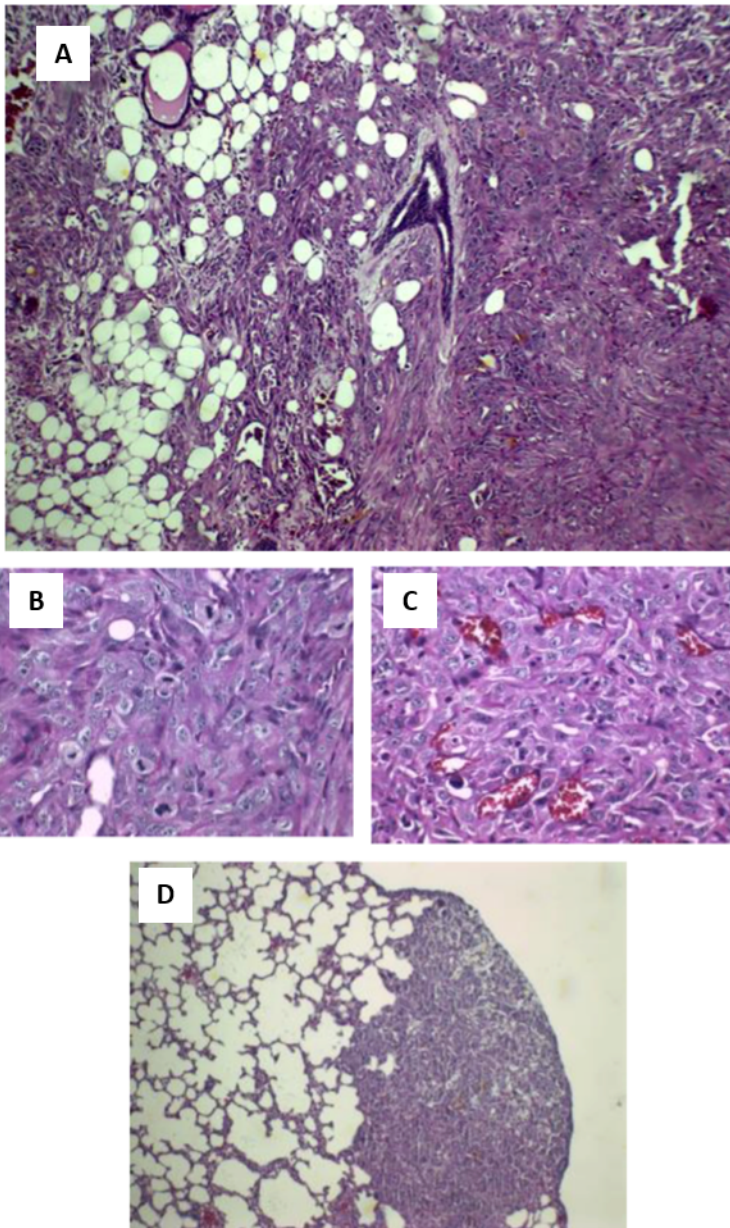


Figura 64. Imágenes histológicas (H&E) de los tumores crecidos en la glándula mamaria. A) Se observa tejido adiposo y conductos galactóforos. Se aprecian B) muchas figuras mitóticas y C) elevada vascularización. D) Metástasis en pulmón, que se observó en la mayoría de los animales.

Así mismo, se realizó un estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales (HER-2, progesterona, estrógeno), Ki-67, E-cadherina, S-100 y EGFR. Los tumores presentaron alta inmunoreactividad para Ki-67 en torno al 30-40% (marcador de proliferación). A su vez, los tumores mamarios presentaban un fenotipo triple negativo ya que mostraban negatividad para todos los receptores hormonales (Fig. 65). Asimismo, la expresión de EGFR resultó ser inferior al 10%, la de E-cadherina positiva y S-100 fue negativa.

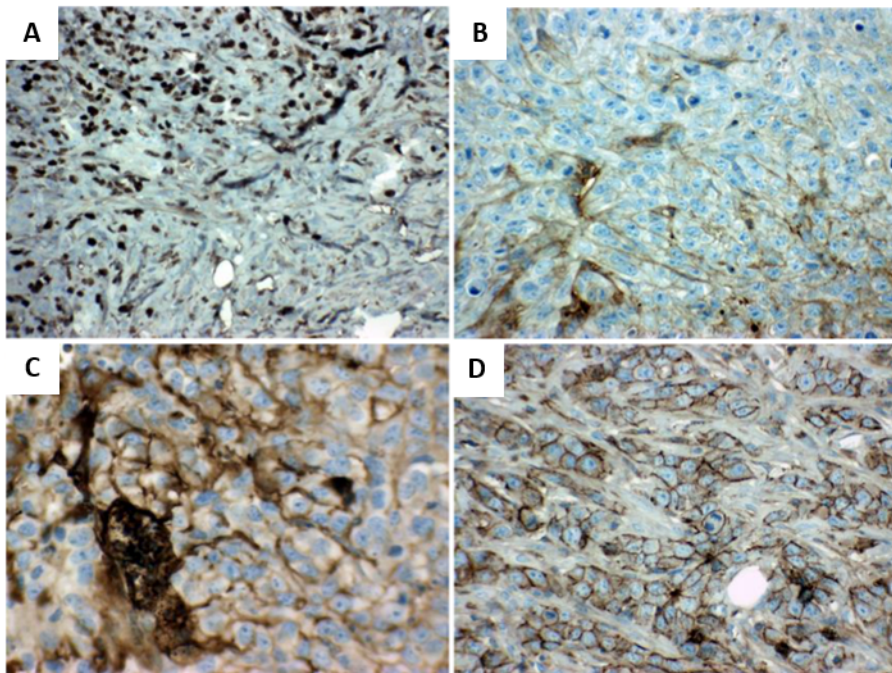


Figura 65. Imágenes representativas del estudio inmunohistoquímico. A) Positividad para Ki-67. B) Negatividad para HER-2. C) Positividad a EGFR menor del 10%. D) Positividad intensa y regular para E-cadherina.

Debido al bajo índice de expresión de EGFR tanto en la línea celular 4T1 como en el tumor generado a partir de éstas decidimos usar la nanopartícula sin el agente vector, es decir, Ag@APY, en los posteriores ensayos en modelos animales.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de Ag@APY mediante estudio de viabilidad en la línea celular 4T1 (Fig. 66).

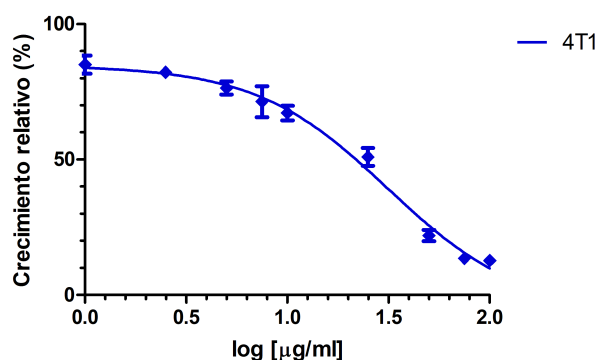


Figura 66. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@APY medida usando el ensayo AlamarBlue® siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad en la línea celular 4T1, transcurridas 72 h tras la exposición. Las células expuestas a concentración 0 reciben la máxima concentración de medio de cultivo sirviendo como control. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

El valor de DL₅₀ que presentan las nanopartículas Ag@APY para la línea celular de cáncer de mama 4T1 es de $30,17 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ y será usado como referencia para las dosis empleadas en los tumores mamarios ensayados.

A continuación se procedió un ensayo piloto en un número reducido de ratonas con el objetivo de obtener los datos necesarios para diseñar un proyecto de experimentación en modelo animal a mayor escala. El tratamiento consistió en la inoculación intratumoral de 20 μL de suspensiones acuosas de diferente concentración en nanopartículas. Dichas suspensiones se inocularon tres veces cada 4 días por vía intratumoral. Los animales se dividieron en 3 grupos de 3 ratonas cada uno siendo las dosis para cada grupo las detalladas a continuación:

- Grupo 1 (Gr 1): 3,5 μg de Ag@APY en un volumen final de 20 μL .
- Grupo 2 (Gr 2): 35 μg de Ag@APY en un volumen final de 20 μL .
- Grupo 3 (Gr 3): Grupo control al que se administraron 20 μL de suero fisiológico.

Para determinar el punto de comienzo del tratamiento se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral, de manera que el tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaban un tamaño crítico mínimo que permitiera

terminar el estudio sin provocar sufrimiento en el animal. Así mismo, la figura 67 recoge el peso promedio de los animales en los diferentes tratamientos. Como se observa en esta misma figura tanto el peso de las ratonas como el comportamiento observado durante el tratamiento reflejaron que no se produjo sufrimiento de los animales.

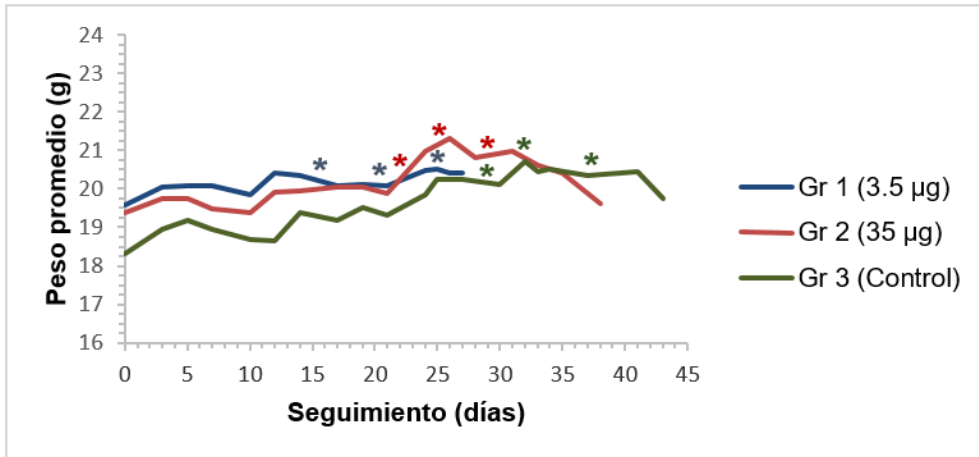


Figura 67. Peso promedio de las ratonas durante el experimento en función del grupo de estudio. Gr1 (3,5 µg en 20 µL); Gr2 (35 µg en 20 µL); Gr3, grupo control. * denota el día de inoculación del tratamiento.

Para evaluar la progresión tumoral a lo largo del ensayo se estimó el volumen de los tumores. Para ello, se utilizó un calibre con el que se midió el largo y el ancho de los tumores cada dos días. La fórmula empleada para determinar el volumen fue la siguiente:

$$Volumen = \frac{(Ancho)^2 \times Largo}{2}$$

En la figura 68 se recoge la evolución del volumen tumoral promedio en los diferentes grupos de tratamiento ensayados.

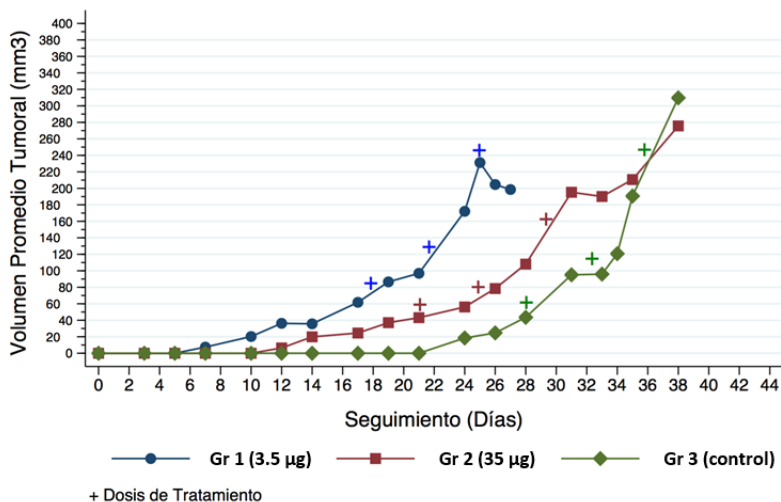


Figura 68. Curva de crecimiento tumoral de los diferentes grupos. Ag1 3,5 µg Ag@APY; Ag2, 35 µg Ag@APY; Ag3, grupo control. El signo “+” indica los días en los que se realiza el tratamiento.

Para el cálculo del tamaño de los tumores registrado durante el tratamiento no se tuvo en cuenta la profundidad de los tumores. Cuando se extirparon los tumores se observó que éstos, en general, tenían una altura considerable, por lo que los volúmenes calculados estaban por debajo del valor real. Para solventar este problema, se usó el peso de los tumores extirpados. La figura 69 recoge el peso medio de los tumores en los dos grupos de tratamiento y del grupo control.

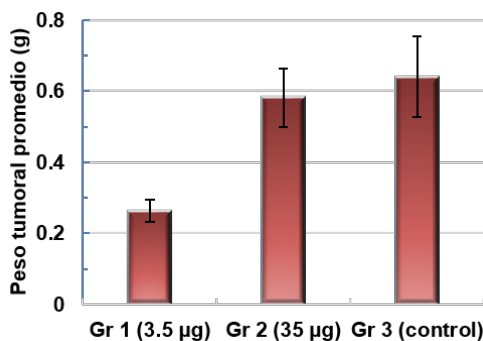


Figura 69. Peso de los diferentes tumores extirpados tras el tratamiento con Ag@APY.

Se observa cómo a dosis bajas de nanopartículas el progreso del tumor parece frenarse, aunque sin llegar a la reversión completa del mismo. Sin embargo, los efectos a dosis altas de nanopartículas no ofrecen resultados diferenciadores con respecto a los tumores no tratados.

Es necesario indicar que la presión intratumoral, así como la presencia de pústulas, impedían la correcta posología de las nanopartículas, dado que éstas tendían a extravasarse por dichas pústulas con la propia presión de la inyección. Para verificar la presencia de las nanopartículas en el tejido tumoral una vez finalizado el tratamiento decidimos hacer microscopía TEM de los tumores. Como puede observarse en la figura 70, las nanopartículas permanecían en el tejido tumoral una vez explantado el mismo.

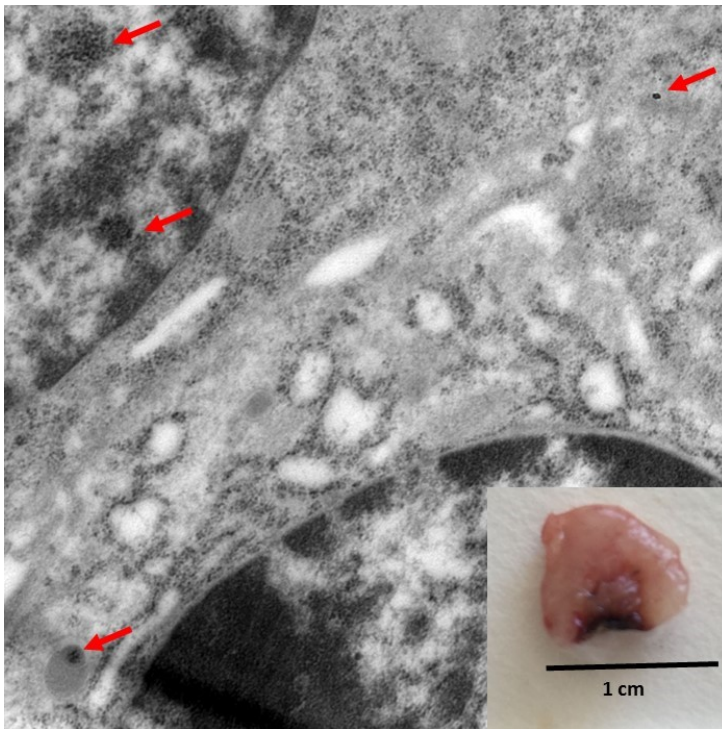


Figura 70. Imagen de TEM demostrando la presencia de Ag@APY (flechas rojas) en uno de los tumores extirpado. Imagen inserta de un corte longitudinal del tumor.

Aunque el ensayo piloto se trata de un ensayo a muy pequeña escala y preliminar, los datos obtenidos han sido de una enorme relevancia a la hora de optimizar el diseño del proyecto de experimentación animal. Por ejemplo, la problemática que encontramos a la hora de realizar la inyección intratumoral, debido a la elevada presión existente en el tumor y la necrosis que se generaba en la zona central, se ha solventado inoculando las células tumorales en una matriz de matrigel, que favorece un crecimiento más uniforme, y optando por realizar inyecciones peritumorales en lugar de intratumorales.

Conclusiones

Se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de plata funcionalizadas con 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina. A pesar de que no pueden ser sintetizadas en agua debido a la insolubilidad del ligando, la síntesis puede llevarse a término en presencia de DMF, de manera similar a los nanosistemas desarrollados en los Capítulos 2 y 3.

La caracterización mediante espectroscopía de infrarrojos demuestra que el ligando está unido a las nanopartículas a través del grupo tiol, quedando disponibles en superficie para su interacción los grupos amino.

Las nanopartículas tienen un tamaño muy pequeño (en torno a 5 nm), presentándose con una distribución estrecha y uniforme, así como un elevado ζ positivo.

Los grupos amino libres en superficie han permitido la unión covalente y direccionada de un anticuerpo ampliamente utilizado para el direccionamiento de forma selectiva a células tumorales. Nuestros ensayos biológicos en líneas celulares tumorales modelo han demostrado que nuestro nanosistema funciona como un prometedor agente antiproliferativo en lo que al tratamiento selectivo de tumores se refiere. No obstante, es necesario continuar estudiando sus efectos a nivel molecular así como dirigido a otras dianas tumorales más específicas. Así mismo, el nanosistema Ag@APY ha demostrado efectos antiproliferativos en tumores mamarios inducidos en Ratonas BALB/c a dosis bajas cuando se aplica vía intratumoral.

Capítulo 5.

Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido tánico (Ag@TA)

*Papel del ácido tánico en tumores
con sobreexpresión de EGFR*

Resumen

El ácido tánico presenta múltiples efectos contra el cáncer, siendo especialmente prometedor en aquellos tipos que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico, involucrado en la patogénesis y progresión de una amplia variedad de tumores. En virtud de ello, el ácido tánico es capaz de modular la activación y señalización de este receptor, provocando, en última instancia, la muerte por apoptosis de las células tumorales.

Las nanopartículas metálicas presentan ventajas en cuanto al diagnóstico, tratamiento y seguimiento selectivo de tumores se refiere. Por un lado, la capacidad de ser vectorizadas a tejidos de manera específica permite disminuir los efectos secundarios de los agentes citostáticos gracias a su mayor especificidad. Por otro, las propiedades ópticas debidas al plasmón de superficie convierten a estos nanosistemas en excepcionales agentes diagnósticos. La suma de esta función diagnóstica y de tratamiento, lo que se conoce como teragnóstica, explora sus propiedades únicas, permitiendo el desarrollo de tratamientos eficaces y con un riesgo reducido en comparación con las terapias convencionales.

En este capítulo se describe la optimización de un método de síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido tánico. El nanosistema desarrollado ha sido caracterizado por técnicas espectroscópicas. Además, ha demostrado una gran versatilidad ante diferentes condiciones como puedan ser los cambios de pH o la estabilidad en medios complejos. Los ensayos *in vitro* llevados a cabo con el nanosistema demuestran un toxicidad selectiva, permitiendo, a concentraciones controladas, la eliminación de las células tumorales que sobreexpresan EGFR sin afectar a las células sanas.

Antecedentes

Los polifenoles son compuestos bio-sintéticos de origen vegetal que se caracterizan estructuralmente por la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a anillos de benceno. El ácido tánico (TA de sus siglas en inglés) es un compuesto polifenólico derivado del extracto de ciertas plantas vasculares, que se encuentra dentro de la familia de los taninos. Estos polifenoles son metabolitos secundarios acumulados en lugares tan dispares como la hoja del té verde, los frutos de la uva o la corteza de roble.²⁰⁰ El TA presenta una variada actividad biológica, incluyendo efectos anticancerígenos,^{201,202} antioxidantes,²⁰³ antimicrobianos y antivirales.²⁰⁴

Desde el punto de vista químico, el TA destaca debido a su gran número de grupos hidroxilos fenólicos, en comparación con otros taninos (Fig. 71). Estos grupos, además de estar relacionados con el comportamiento biológico del TA, otorgan a la molécula función de soporte en estructuras complejas, al poder formar puentes de hidrógeno.

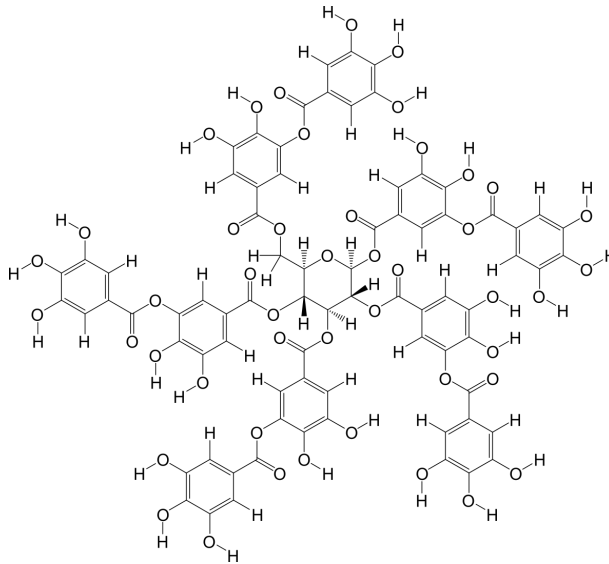


Figura 71. Estructura química del ácido tánico ($C_7H_6O_5$).

Desde el punto de vista biológico, el TA es una molécula compleja con un comportamiento dual; por una parte, el TA es un eliminador de radicales y, por lo tanto, un agente quimiopreventivo. Por otra parte, el TA es capaz de inducir estrés oxidativo en determinadas condiciones.^{205,206} Por todo ello, este compuesto exhibe propiedades anticancerígenas,²⁰⁷⁻²⁰⁹ así como actividad pro-apoptótica, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de apoptosis intrínseca.^{210,211}

Otra característica importante del TA en la terapia del cáncer es que su actividad se asocia a receptores que controlan la proliferación no deseada de células. Algunos estudios recientes demuestran que las células de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivos son más sensibles a la apoptosis inducida por TA que las células de cáncer de mama triple negativo y las células normales epiteliales de mama.^{212,213} Así mismo, el TA juega un papel importante en la modulación de la activación del EGFR y sus rutas de señalización aguas abajo.²¹⁴ Este receptor es una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, cuya activación desencadena una cascada de señales moleculares que provoca la proliferación y diferenciación celular. Cuando se encuentra sobreexpresado provoca resistencia a la apoptosis, angiogénesis y metástasis. Esto ocurre en una amplia variedad de tumores, incluyendo gliomas y carcinomas de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, ovario, mama, vejiga y riñón. Por tanto, la desregulación en la expresión y la señalización de este receptor juega un papel crítico en la etiología del cáncer. Así, el EGFR se ha convertido en un objetivo cardinal en la terapia del cáncer, tanto en términos de inhibición específica¹⁵⁰⁻¹⁵² como de vectorización.¹⁵³ Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que podría proporcionar el direccionamiento de TA a EGFR, todavía no se ha desarrollado ningún sistema de liberación de TA a este receptor.

Como hemos visto en capítulos anteriores, la función dual de las nanopartículas de plata como vehículo de drogas y su función diagnóstica debida a las propiedades ópticas derivadas de la resonancia del plasmón de superficie las hacen excepcionales candidatos en la terapia selectiva del cáncer. A su vez, la actividad citotóxica de la plata las sitúan en sí mismas como activo terapéutico en la lucha contra el cáncer.

Dado que el tamaño y la forma de las nanopartículas influyen en sus propiedades no sólo físico-químicas sino también biológicas, es de capital importancia poder controlarlas. Por regla general, las nanopartículas de plata para aplicaciones biomédicas se sintetizan por reducción de la sal de plata.

Durante el proceso de síntesis, parámetros tales como la concentración del agente reductor, la temperatura, el pH o el tipo de agente reductor empleado juegan un papel crucial a la hora de controlar el tamaño y forma de los nanosistemas. Uno de los reductores más populares para sintetizar nanopartículas de plata es el borohidruro de sodio. Dicho compuesto es un reductor fuerte y se utiliza para preparar nanopartículas muy pequeñas (<10nm), mientras que el uso de reductores débiles, como el citrato de sodio, da como resultado la formación de nanopartículas de mayor tamaño (50-80 nm).²¹⁵ En los últimos años, se han descrito síntesis utilizando TA como un reductor eficaz para ajustar el tamaño de las nanopartículas de plata (AgNPs), variando el pH y la relación molar de TA/AgNO₃.^{216,217}

La capacidad de reducción del TA se debe a los numerosos grupos fenólicos que presenta en su estructura. Estos fenoles participan en reacciones redox donando electrones y formando quinonas. Los electrones donados reducen los iones del metal de la sal metálica, M⁺, dando lugar a átomos del metal, M⁰, que formarán las nanopartículas. En la figura 72 se muestra el mecanismo de reacción por el cual ejerce su capacidad reductora el TA mediante la formación de quinonas. El carboxilo de la forma quinónica se une a la superficie de las nanopartículas metálicas quedando la parte restante del polifenol libre para actuar como surfactante y estabilizador de la nanopartícula por repulsión electrostática así como por impedimento estérico.²¹⁸

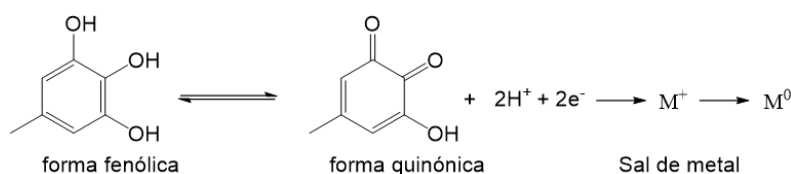


Figura 72. Mecanismo de reacción de la reducción del TA en la síntesis de nanopartículas metálicas. Los grupos fenólicos del TA son oxidados a quinonas con la subsiguiente liberación de electrones que reducen los iones metálicos.

A lo largo de la literatura existen pocas referencias que describan la síntesis de AgNPs usando como ligando orgánico el TA, siendo mucho más común el uso de polímeros orgánicos como el PEG o la PVP o incluso biopolímeros como el quitosano. En estos procedimientos se suelen usar como agentes reductores el borohidruro o el citrato sódico, cumpliendo el TA

únicamente el papel de agente estabilizador. En la tabla 3 se recogen los principales métodos de síntesis de nanopartículas plasmónicas de oro o plata en los que se ha empleado TA durante el proceso.

Tabla 4. Principales métodos de síntesis de nanopartículas plasmónicas funcionalizadas con TA. BH: borohidruro sódico; SC: citrato sódico; Ø: diámetro

Referencia	Sal metálica	Reductor	T (°C)	Ø* (nm)
Ref. ²¹⁹	AgNO ₃	SC, TA	25	13
Ref. ²¹⁹	AgNO ₃	SC, TA	100	33
Ref. ²²⁰	AgNO ₃	SC, TA	60, 100	10-30
Ref. ⁹³	AgNO ₃	TA	25	20
Ref. ²²¹	HAuCl ₄	TA	25	8
Ref. ²²¹	HAuCl ₄	TA	25	12
Ref. ²²²	HAuCl ₄	TA, K ₂ CO ₃	60	6
Ref. ²²³	HAuCl ₄	TA	60	17
Ref. ²²³	HAuCl ₄	SC, TA	60	3

De estos trabajos se desprende que la temperatura, la relación molar entre la sal metálica y el TA, así como el valor de pH son los principales factores que influyen en el tamaño, índice de polidispersión y estabilidad coloidal de las nanopartículas resultantes. En este sentido, un estudio realizado por *Cataldo et al.* reveló que las AgNPs sintetizadas empleando TA producían suspensiones coloidales más estables que aquellas preparadas por reducción con NaBH₄.²²⁴ Así mismo, se ha demostrado que ajustar el pH de las disoluciones de TA a valores alcalinos antes de la adición de la sal de plata, mejora la capacidad de reducción y estabilización del TA, permitiendo que la síntesis transcurra a temperatura ambiente y en un intervalo de tiempo menor.²¹⁸

El objetivo del presente capítulo fue sintetizar AgNPs funcionalizadas en superficie con TA. Para ello, comparamos las nanopartículas resultantes usando el agente reductor común a las síntesis descritas en anteriores capítulos, el borohidruro sódico, frente a la propia capacidad reductora del TA. Una vez optimizada la síntesis, se evaluó la estabilidad hidrodinámica del

nanosistema frente a cambios de pH, así como en medios complejos. Finalmente se evaluó la capacidad citotóxica del sistema en diferentes líneas tumorales y no tumorales que se diferenciaban, principalmente en el grado de expresión de EGFR.

Resultados y discusión

El TA controla el crecimiento de las AgNPs obteniéndose coloides monodispersos, estables y altamente funcionalizados con el polifenol

La síntesis de nanopartículas de plata llevada a cabo en este capítulo se realizó mediante reducción química utilizando el TA como único agente reductor versus borohidruro sódico, variando la relación molar entre este tanino y la sal de plata, así como el pH de la suspensión, con objeto de controlar el tamaño final de las nanopartículas resultantes. Para lograr este propósito se han desarrollado tres variantes de síntesis de AgNPs y TA, todas ellas en medio acuoso. En las dos primeras se empleó como agente reductor borohidruro sódico y como agente estabilizador el TA. La diferencia entre los dos procedimientos de síntesis radica en el orden de adición sobre la disolución de plata del borohidruro y del TA. En este sentido, llamamos Ag@BH+TA a las nanopartículas donde el borohidruro se adicionó en un primer momento y Ag@TA+BH a las que este reductor se adicionó después del TA. El lapso de tiempo entre la adición del BH y el TA sobre la disolución de plata para ambas síntesis fue de 15 minutos. Por otro lado, se llevó a cabo un tercer método de síntesis basado en el método descrito por Yanzhen et al. con leves modificaciones y donde el propio TA ejerce tanto la función de agente reductor como de agente estabilizador.⁹³ En la tabla 5 se exponen las principales condiciones de síntesis, quedando estas descritas de manera pormenorizada en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 5. Principales condiciones de síntesis para la obtención de nanopartículas de plata y TA usadas en este capítulo.

Nanosistema	Sal del metal	Reductor	T (°C)	t (min)
Ag@BH+TA	AgNO ₃ (1mL, 0,01M)	1º NaBH ₄ (5mL, 0,03M); 2º TA (1mL, 2,2mM)	4	20
Ag@TA+BH	AgNO ₃ (1mL, 0,01M)	1º TA (1mL, 2,2mM) 2º NaBH ₄ (5mL, 0,03M)	4	20
Ag@TA	AgNO ₃ (0.5 mL 0,1 M)	TA (19,5 mL, 2,5mM) NaOH (280µL, 0,5M)	25	120

En la figura 73 se muestra la apariencia de las suspensiones coloidales obtenidas a partir de los tres procedimientos. El color de la muestra es uniforme en todas las síntesis no observándose formación de precipitado en ninguna de las mismas.

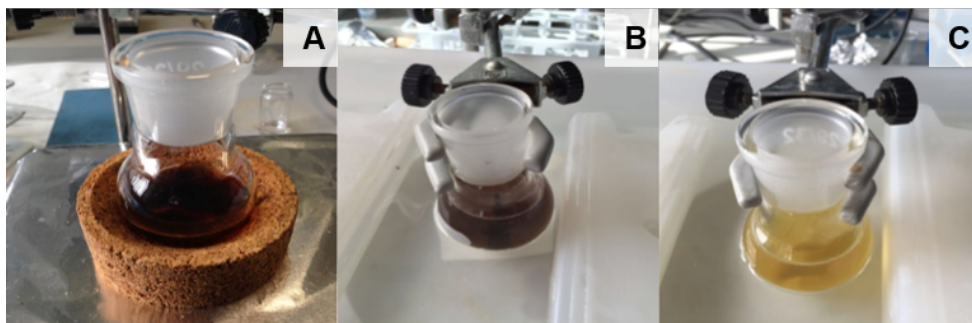


Figura 73. Síntesis de las diferentes Ag@NPs y TA. (a) Nanopartículas Ag@TA; (b) Nanopartículas Ag@TA+BH; (c) Nanopartículas Ag@BH+TA.

El espectro de UV-Vis del plasmón superficial de las AgNPs nanopartículas de plata ofrece, de forma sencilla, una estimación sobre la forma de las nanopartículas, tamaño, polidispersión, así como estabilidad de las nanopartículas. En la figura 74 se representa el plasmón superficial de las nanopartículas desarrolladas una vez purificadas del medio de reacción mediante un proceso de centrifugación del coloide.

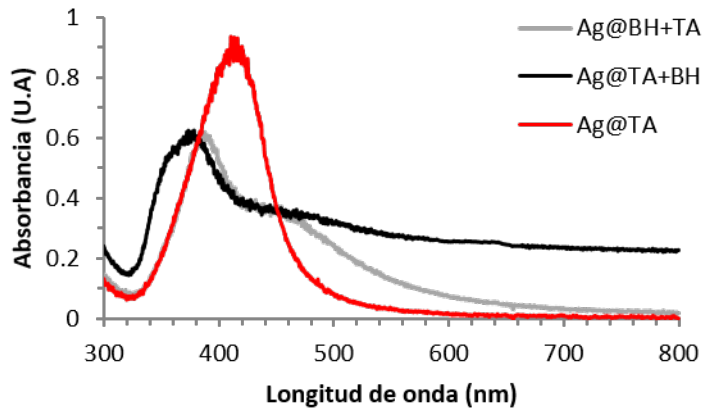


Figura 74. Espectros de UV-Vis de las AgNPs y TA. Comparación de los plasmones resultantes de los diferentes métodos de síntesis de AgNPs y TA. Línea gris, Adición de TA antes de la reducción rápida mediante borohidruro; línea negra, AgNPs reducidas mediante borohidruro (TA se adiciona como último paso de síntesis); línea roja, AgNPs reducidas con el propio TA.

Para el caso de las dos síntesis en las que ha intervenido el borohidruro como agente reductor durante el proceso de síntesis, el máximo del plasmón superficial se sitúa por debajo de los 400 nm. Este valor es indicativo de un reducido tamaño y está relacionado con el pequeño tamaño que se obtiene cuando se usa un agente reductor fuerte como es el caso del borohidruro. Los agentes reductores fuertes favorecen la nucleación rápida en detrimento del crecimiento de estos núcleos formados. Del mismo modo, la cola ancha que presentan ambas síntesis es indicativa de una polidispersión en el tamaño final de las nanopartículas, presumiblemente debido a un pobre control en la estabilización durante el crecimiento de los núcleos metálicos.

El plasmón resultante de la síntesis Ag@TA muestra un máximo de absorbancia a 410 nm siendo este estrecho y sin presencia de cola (Fig. 74). Esto nos hace pensar que nos encontramos con AgNPs esféricas y altamente monodispersas, si bien, el tamaño es superior al de las dos síntesis llevadas a cabo por la reducción con borohidruro.

Estos resultados pueden deberse a que, para el caso del BH, al estar el TA en su forma fenólica, este tiene menos afinidad por la superficie de la plata, siendo el recubrimiento de la nanopartícula menor. Hay que tener en cuenta que, en este caso, la afinidad será por transferencia electrónica desde el anillo

aromático. En cambio, cuando el propio TA ejerce como reductor se produce la quinona, generándose carbonilos que tienen mayor afinidad por la superficie de plata (Fig. 72).

El nanosistema Ag@TA presenta buena estabilidad coloidal y un reducido diámetro hidrodinámico

Para demostrar los resultados observados en espectroscopía de UV-Vis se evaluó el diámetro hidrodinámico de los coloides resultantes de los tres métodos de síntesis mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS). Así mismo, se determinó el ζ que presentaban las nanopartículas en agua.

Tabla 6. Valores de ζ y tamaño hidrodinámico de las diferentes síntesis llevadas en agua Milli-Q. Comparativa de tamaño hidrodinámico (HD) de Ag@BH+TA, Ag@TA+BH y Ag@TA estimado por DLS.

	Ø (nm)	ζ (mV)
Ag@BH+TA	6 ± 3	(-) 30
Ag@TA+BH	5 ± 2	(-) 30
Ag@TA	25 ± 5	(-) 25

Como era de esperar tras observar los espectros de UV-Vis de las diferentes nanopartículas, las síntesis reducidas por el BH presentan un tamaño muy pequeño, en torno a los 5 nm, así como una elevada dispersión de tamaños. Estos resultados se correlacionan con menores longitudes del máximo del plasmón superficial así como la anchura del plasmón con la desviación del tamaño medio. Estos valores son muy parecidos para ambas síntesis, si bien en la que el TA se adiciona antes que el BH el tamaño es aún más pequeño, siendo a su vez menor su polidispersión. Presumiblemente, esto se debe a que el TA controla el crecimiento de los núcleos formados previamente a la adición del BH.

En el caso de la síntesis en la que el propio TA actúa como agente reductor y estabilizador, su DH medio es considerablemente superior siendo la relación del tamaño y la dispersión de este mucho más estrecha (25 ± 5 nm).

Esto se debe a que el TA, al actuar como agente reductor lento favorece el crecimiento de los núcleos metálicos de manera controlada.²¹⁷

El ζ de todas las síntesis es negativo y comprendido entre -25 y -30 mV. El valor negativo del ζ se debe a la presencia de grupos hidroxilo cargados negativamente en la superficie de las nanopartículas derivados del TA. Como todas las medidas se encuentran alrededor del valor absoluto de $|30\text{mV}|$, nos indica que estas nanopartículas presentan buena estabilidad coloidal para aplicaciones biomédicas en medio acuoso.²²⁵

La síntesis Ag@TA presenta un DH adecuado para aplicaciones biomédicas siendo su distribución estrecha. Así mismo, presentan una gran estabilidad frente a procesos de purificación mediante centrifugaciones suaves. Estas propiedades nos hicieron decantarnos por continuar los siguientes ensayos únicamente con el nanosistema Ag@TA.

La espectroscopía FTIR revela la correcta funcionalización superficial de las nanopartículas Ag@TA

Se analizó la funcionalización de la superficie de las nanopartículas Ag@TA mediante espectroscopía FTIR. La comparación entre los espectros del TA y las nanopartículas Ag@TA dializadas (Fig. 75) demuestra la adecuada funcionalización de la superficie de las Ag@TA con el TA.

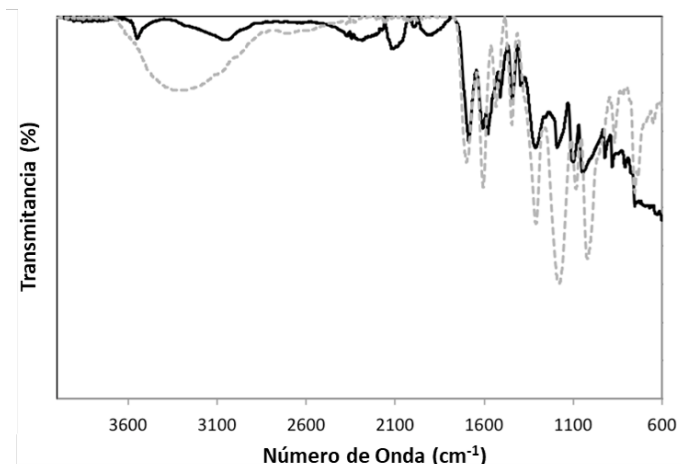


Figura 75. Comparación entre los espectros FTIR de Ag@TA (línea negra sólida) y TA (línea gris punteada).

Como se observa en la figura la totalidad de las bandas relevantes del TA permanecen casi invariables en las nanopartículas, si bien su intensidad es mucho mayor debido a la amplificación SEIRAS. Una de las bandas más relevantes del TA, correspondiente a los grupos fenol a 1202 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) permanece en la misma posición aunque con bastante más intensidad. Lo mismo ocurre con la banda a 1450 cm^{-1} ($\delta_{\text{O-H}}$). Al mismo tiempo, las bandas propias del grupo éster, a 1712 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), 1319 cm^{-1} y 1029 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$ sim y asim, respectivamente), permanecen inalteradas, lo que nos deja la información de que, en las condiciones de síntesis, no se produce una hidrólisis del TA con la consiguiente formación de ácido gálico libre. Por último, es notorio el cambio de forma en la banda correspondiente al sistema aromático del ácido tánico a 1613 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$), el cual puede estar justificado por la pérdida parcial de aromaticidad del mismo debido a la interacción metal-orgánico.

Las Ag@TA son hidrodinámicamente estables en un amplio rango de pH, así como en medio de cultivo

Para evaluar como afectaba la variación del pH a la estabilidad de las nanopartículas en medio acuoso, se modificó este en el rango comprendido entre pH 2 y pH 10. Seguidamente, se registraron los cambios en el plasmón

de superficie mediante espectroscopia de UV-Vis transcurridas 24 h tras el ajuste del pH (Fig. 76).

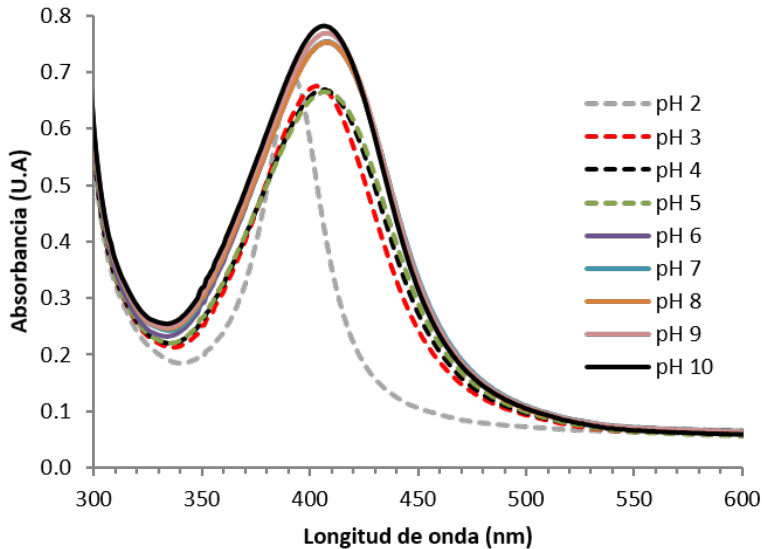


Figura 76. Espectros de absorción de Ag@TA resuspendida en agua a diferentes valores de pH. El pH de la suspensión se ajustó adicionando las cantidades necesarias de NaOH (0,1 M) ó HCl (0,1 M). Tiempo de medida 24 h tras el ajuste.

Es llamativo observar que a pH muy ácido (pH 2) el máximo de absorción se desplaza considerablemente a menores longitudes de onda. Esto puede ser debido, por un lado, a la aparición de fenómenos de hidrólisis por parte del TA que se fragmenta pasando a convertirse en sus monómeros libres de ácido gálico. Por otro lado, y como se observa en la imagen de la figura 77, a las 24 h en medio muy ácido (pH 2) se observa una disminución intensa del color de la muestra, debido a la capacidad del HCl para disolver las AgNPs a la sal de plata metálica formándose AgCl. En cuanto a las condiciones en medio básico, se aprecia que el plasmón aumenta considerablemente a valores de pH comprendidos entre pH 7 y pH 10. Esto se debe a que los OH del TA se desprotonan apareciendo nuevas cargas negativas que repelen la interacción entre las nanopartículas. En este sentido, podemos concluir que el nanosistema Ag@TA es estable en un amplio intervalo de pHs, incluyendo el fisiológico.

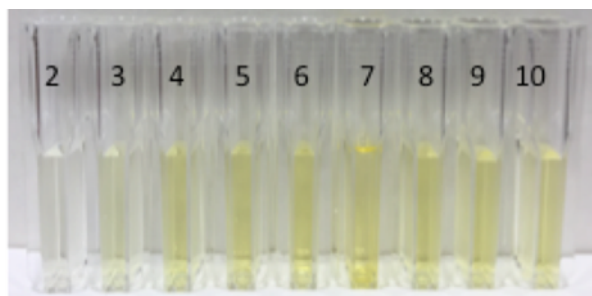


Figura 77. Imagen de la suspensión coloidal de Ag@TA a diferentes valores de pH (2-10) transcurridas 24 horas de la síntesis.

Cabe añadir que en ninguno de los valores de pH estudiado se aprecia variación en la coloración de la muestra o aparición de precipitado que indicase una desestabilización del nanosistema. Únicamente a pH muy ácido (pH 2) se observa una disminución de la intensidad del color de la muestra debido al proceso de disolución de la plata metálica por el HCl.

Antes de realizar los experimentos en modelos celulares se procedió a la evaluación de la estabilidad del sistema Ag@TA en medio biológico. Para ello, se resuspendió el nanosistema a la misma concentración en agua Milli-Q y en medio de cultivo suplementado. El medio de cultivo fue DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), al tratarse del mismo que se usará en los ensayos de citotoxicidad. A las 2 h de incubación se registró su espectro de UV-Vis, como se muestra en la figura 78.

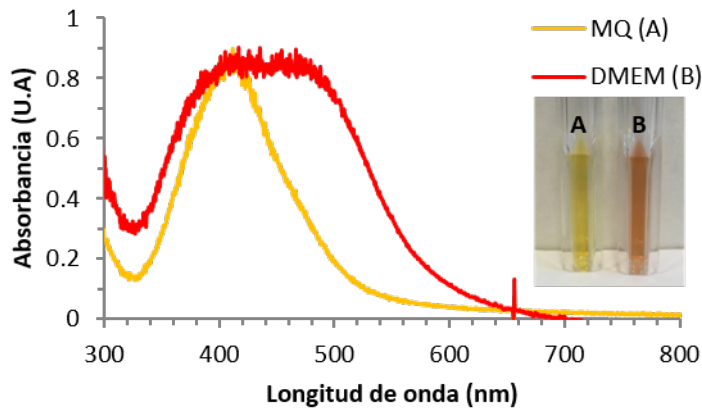


Figura 78. Ensayo de estabilidad en medio biológico de Ag@TA. Espectros de UV-Vis del sistema Ag@TA en agua Milli-Q (A/línea amarilla) y en medio de cultivo suplementado (B/línea roja) transcurridas 2 h desde la incubación. Imagen inserta, fotografía de la suspensión de nanopartículas en los diferentes medios.

Si bien en medio de cultivo el plasmón de las Ag@TA se ensancha considerablemente, no se observa ningún tipo de precipitado en la muestra. Esta variación en la anchura del plasmón se puede justificar por la interacción de las nanopartículas con las sales y proteínas del medio biológico.

Junto a los datos de estabilidad en función del pH del sistema podemos concluir que Ag@TA presenta una gran estabilidad hidrodinámica de cara a su uso en ensayos en modelos celulares.

Ag@TA presenta mayor citotoxicidad en células tumorales y tumorales con elevada expresión de EGFR que en las sanas

Para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA se utilizó la línea celular de carcinoma epidermoide A431, la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), así como la línea celular 4T1, modelo de cáncer de mama en ratones.²²⁶ A431 es ampliamente utilizada como modelo celular para estudiar los enfoques terapéuticos dirigidos a EGFR, debido a la alta expresión de este receptor. HDF deriva de la dermis de la piel humana sana, por lo que la usamos como control de célula no tumoral, presentando un expresión de EGFR significativamente menor a A431.²²⁷ Por otro lado, 4T1 es triple negativo, es

decir, no tiene sobreexpresado Her1 (EGFR, ErbB1) y se utilizó para poder evaluar la posibilidad de futuros estudios en el modelo de cáncer de mama de ratón desarrollado en el capítulo 4. Con este objetivo, se estudió la citotoxicidad de las Ag@TA y del TA libre en las citadas líneas celulares utilizando el ensayo de AlamarBlue®. Para ello, se incubaron los cultivos celulares con concentraciones crecientes de nanopartículas o TA en un rango de concentración desde 1 µg/mL hasta 100 µg/mL registrándose la actividad metabólica transcurridas 48 h del inicio de la exposición.

Para el caso de la línea celular A431, si bien tanto el TA libre como el sistema Ag@TA presentan efectos citotóxicos, este es muy superior en el caso del coloide. Lo cual puede deberse al efecto sinérgico de la plata y el TA (Fig. 79).

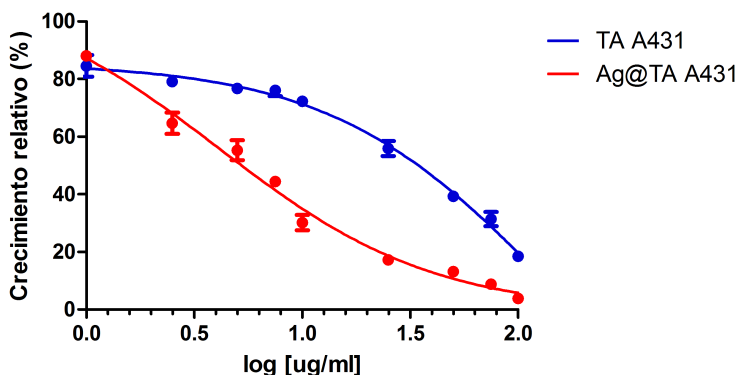


Figura 79. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células A431. Resultados obtenidos por el ensayo AlamarBlue®, siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

En el caso de la exposición en HDF no se observa aparición de efectos tóxicos hasta superados los 30 µg/mL siendo los mismos muy parecidos tanto para el TA libre como para el sistema Ag@TA. Este resultado debe estar ligado a la menor expresión de EGFR en la superficie de esta línea celular (Fig. 80). Como sucedía antes, la DL₅₀ es menor para la nanopartícula que para el TA debido a la sinergia plata/TA.

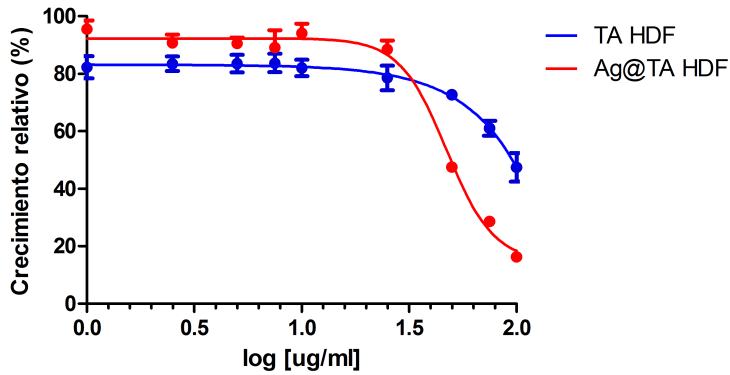


Figura 80. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células HDF. Resultados obtenidos por el ensayo AlamarBlue®, siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

En el caso del cultivo de células 4T1 el efecto citotóxico es más pronunciado en el TA libre que en el sistema Ag@TA a bajas concentraciones, sucediendo lo contrario a concentraciones superiores a la dosis letal 50. Si bien este hecho es relevante se sale del objeto de estudio de la presente memoria y va a ser abordado en profundidad en otras líneas de investigación del grupo. En cuanto a la dosis letal 50, esta es similar en ambos casos, y se encuentra comprendida entre la de A431 y la de las células sanas, HDF (Fig. 81).

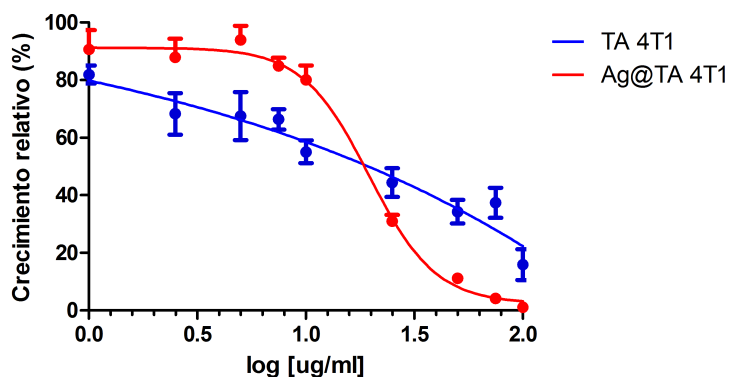


Figura 81. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA y TA libre en las células 4T1. Resultados obtenidos por el ensayo AlamarBlue[®], siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

Si comparamos en una misma gráfica el efecto de Ag@TA sobre las tres líneas celulares interpretamos que es mucho más citotóxica para la línea celular tumoral que sobreexpresa EGFR (Fig. 82). Este dato es muy valioso dado que la DL_{50} para HDF es más de 10 veces superior a la presentada por la línea tumoral A431 (tabla 7), hablándose entonces de un tratamiento muy selectivo para las células tumorales con sobreexpresión de EGFR. En cuanto a la toxicidad en 4T1, tanto el TA como la plata inducen estrés oxidativo, por lo que es normal que afecten a una línea tumoral que, aunque no sobreexpresen EGFR, posee un elevado estrés oxidativo de partida por el hecho de ser tumoral.

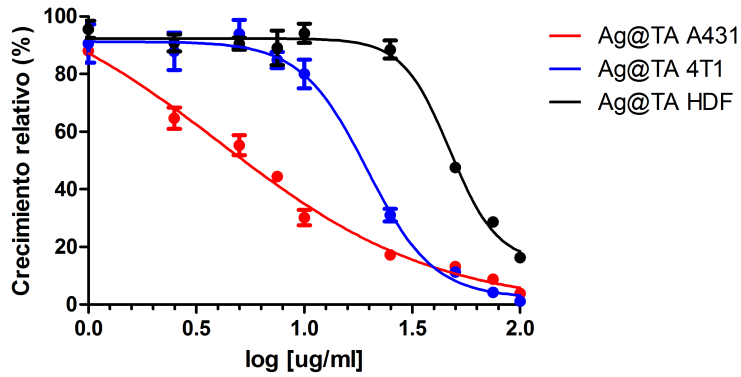


Figura 82. Citotoxicidad de las nanopartículas Ag@TA en las células A431, HDF y 4T1. Resultados obtenidos por el ensayo AlamarBlue[®], siendo la actividad metabólica el punto final de toxicidad transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (n=3).

En la tabla 7 se recogen los valores de DL₅₀ de las condiciones ensayadas.

Tabla 7. Valores de DL₅₀ para Ag@TA en las líneas celulares A431, HDF y 4T1 transcurridas 48 h tras el inicio de la exposición a las nanopartículas.

	DL ₅₀ Ag@TA ($\mu\text{g/ml}$)
A431	4,07 \pm 1,65
HDF	47,86 \pm 1,05
4T1	19,49 \pm 1,07

Conclusiones

La síntesis de nanopartículas de plata llevada a cabo en este capítulo se realizó mediante reducción química utilizando el TA como único agente reductor versus borohidruro sódico. Esta síntesis se realiza en un único paso, siendo la duración típica de dos horas y obteniendo un rendimiento superior al 75%.

La caracterización físico-química de las nanopartículas, se demostró que poseían un índice de polidispersión bajo, siendo su diámetro medio de 25 ± 5 nm, un tamaño adecuado para aplicaciones biomédicas. El coloide es muy estable, presentando un ζ negativo en torno a 25 mV. La correcta funcionalización de las nanopartículas con TA se demostró mediante espectroscopía FTIR.

Las nanopartículas son estables en un amplio rango de pH (2-10), así como en medio de cultivo suplementado.

Los ensayos de citotoxicidad demuestran que el coloide Ag@TA tiene actividad selectiva en líneas celulares tumorales con sobreexpresión de EGFR siendo necesaria una dosis 10 veces mayor para producir los mismos efectos tóxicos en la línea celular no tumoral que usamos de control.

Conclusiones Generales

- Se ha desarrollado un método general de síntesis, y en un sólo paso, para la obtención de nanopartículas de oro y plata funcionalizadas con tioles de cadena corta.
- Las nanopartículas resultantes son esféricas, presentando una estrecha dispersión de tamaños en torno a los 5 nm y un alto grado de recubrimiento orgánico.
- Las nanopartículas Ag@NH₂ son estables en un elevado rango de pH y no son tóxicas en el rango 1-30 µg/mL, pudiendo ser usadas como agente teragnóstico a dosis bajas o como coadyuvante de tratamiento antitumoral a dosis altas.
- El sistema Au@APY no muestra toxicidad significativa en el rango (1-100 µg/mL) demostrando un rendimiento de transfección de DNA adecuado sin producir efectos tóxicos.
- El sistema Ag@APY ha demostrado citotoxicidad intrínseca selectiva dirigida al receptor EGFR.
- Se ha desarrollado un modelo murino de experimentación animal para realizar ensayos de actividad antitumoral. Este modelo presenta ventajas sobre los convencionales, ya que los ratones son inmunocompetentes (BALB/c) y el tumor (4T1), aun siendo murino, es un reconocido modelo de estudio para cáncer de mama humano.
- El sistema Ag@APY ha demostrado a dosis bajas efecto significativo en la reducción del progreso tumoral en el modelo de cáncer de mama en ratones BALB/c desarrollado.
- Se han sintetizado nanopartículas de plata y ácido tánico (Ag@TA) con una distribución estrecha de tamaño en torno a 25 nm y elevado ζ negativo. Estas nanopartículas son estables en un amplio rango de pH, incluido el pH fisiológico.
- El sistema Ag@TA ha demostrado buenos resultados de toxicidad dirigida en líneas celulares tumorales que sobreexpresan EGFR a concentraciones inocuas para las células no tumorales control.

Referencias

1. YAN, S.-K. *et al.* 'Omics' in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. *Chin. J. Nat. Med.* **13**, 3–21 (2015).
2. von Ranke, N., Fierro, I. & Antunes, A. Trends in Biotechnological Drugs for Cancer Treatment. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **11**, 112–120 (2016).
3. Pavlović, S., Zukić, B. & Stojiljković Petrović, M. Molecular Genetic Markers as a Basis for Personalized Medicine / MOLEKULARNO-GENETIČKI MARKERI KAO OSNOV ZA PERSONALIZOVANU MEDICINU. *J. Med. Biochem.* **33**, 8–21 (2014).
4. Bernkop-Schnürch, A. Reprint of: Nanocarrier systems for oral drug delivery: Do we really need them? *Eur. J. Pharm. Sci.* **50**, 2–7 (2013).
5. Junk, A. & Riess, F. From an idea to a vision: There's plenty of room at the bottom. *Am. J. Phys.* **74**, 825–830 (2006).
6. Zhang, L. & Webster, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* **4**, 66–80 (2009).
7. Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I. & Tamarkin, L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev. Res.* **67**, 47–54 (2006).
8. Freestone, I., Meeks, N., Sax, M. & Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull.* **40**, 270–277 (2007).
9. Bayford, R., Rademacher, T., Roitt, I. & Wang, S. X. Emerging applications of nanotechnology for diagnosis and therapy of disease : a review. *Physiol. Meas.* **38**, R183-203 (2017).
10. Kim, E.-M. & Jeong, H.-J. Current Status and Future Direction of Nanomedicine: Focus on Advanced Biological and Medical Applications. *Nucl. Med. Mol. Imaging (2010)*. **51**, 106–117 (2017).
11. De Franceschi, S. & Kouwenhoven, L. Nanotechnology: Electronics and the single atom. *Nature* **417**, 701–702 (2002).
12. Zhang, Y. *et al.* Nanomaterials-enabled water and wastewater treatment. *NanoImpact* **3–4**, 22–39 (2016).
13. Khitab, A. & Arshad, M. T. Nano construction materials: Review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **38**, 181–189 (2014).
14. Yetisen, A. K. *et al.* Nanotechnology in Textiles. *ACS Nano* **10**, 3042–3068 (2016).
15. Roduner, E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 583 (2006).
16. Morrow, K. J., Bawa, R. & Wei, C. Recent Advances in Basic and Clinical Nanomedicine.

- Med. Clin. North Am.* **91**, 805–843 (2007).
17. Metcalfe, S. M. & Fahmy, T. M. Targeted nanotherapy for induction of therapeutic immune responses. *Trends Mol. Med.* **18**, 72–80 (2012).
 18. Tang, L. *et al.* Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15344–15349 (2014).
 19. Meanwell, N. A. Improving Drug Candidates by Design: A Focus on Physicochemical Properties As a Means of Improving Compound Disposition and Safety. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1420–1456 (2011).
 20. Morachis, J. M., Mahmoud, E. A. & Almutairi, A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. *Pharmacol. Rev.* **64**, 505–519 (2012).
 21. Friedman, A., Claypool, S. & Liu, R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6315–6329 (2013).
 22. Alharbi, K. K. & Al-sheikh, Y. A. Role and implications of nanodiagnostics in the changing trends of clinical diagnosis. *Saudi J. Biol. Sci.* **21**, 109–117 (2014).
 23. Shinde, S. B., Fernandes, C. B. & Patravale, V. B. Recent trends in in-vitro nanodiagnostics for detection of pathogens. *J. Control. Release* **159**, 164–180 (2012).
 24. Bhaskar, S. *et al.* Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 3 (2010).
 25. Prabhu, P. & Patravale, V. The upcoming field of theranostic nanomedicine: An overview. *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 859–882 (2012).
 26. Danie Kingsley, J., Ranjan, S., Dasgupta, N. & Saha, P. Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *J. Pharm. Res.* **7**, 200–204 (2013).
 27. Hood, J. L. Post isolation modification of exosomes for nanomedicine applications. *Nanomedicine* **11**, 1745–1756 (2016).
 28. Daglar, B., Ozgur, E., Corman, M. E., Uzun, L. & Demirel, G. B. Polymeric nanocarriers for expected nanomedicine: current challenges and future prospects. *RSC Adv.* **4**, 48639–48659 (2014).
 29. Férey, G. Nanoporous materials: A selective magnetic sponge. *Nat. Mater.* **2**, 136–137 (2003).
 30. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release* **155**, 344–357 (2011).
 31. Albanese, A., Tang, P. S. & Chan, W. C. W. [Review] The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **14**, 1–16 (2012).

32. Cruje, C. & Chithrani, D. B. Polyethylene Glycol Functionalized Nanoparticles for Improved Cancer Treatment. *Rev. Nanosci. Nanotechnol.* **3**, 20–30 (2014).
33. Abed, N. & Couvreur, P. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **43**, 485–496 (2014).
34. Horvath, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **110**, 787–799 (2009).
35. Novotny, L. & Hecht, B. *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press (2006).
36. Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1759–1782 (2009).
37. Radwan, S. H. & Azzazy, H. M. E. Gold nanoparticles for molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 511–524 (2009).
38. Chen, S., Lee, I. S., Tolbert, W. a, Wen, X. & Dlott, D. D. The optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Am. Chem. B* 668–677 (2003).
39. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* **2**, 681–693 (2007).
40. Krajczewski, J., Kołtątaj, K. & Kudelski, A. Plasmonic nanoparticles in chemical analysis. *RSC Adv.* **7**, 17559–17576 (2017).
41. Zheng, Y. B., Kiraly, B., Weiss, P. S. & Huang, T. J. Molecular plasmonics for biology and nanomedicine. *Nanomedicine* **7**, 751–770 (2012).
42. *Practical Raman Spectroscopy*. (Springer Berlin Heidelberg, 1989).
43. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science (80-.)*. **275**, 1102–1106 (1997).
44. Lal, S. *et al.* Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 898–911 (2008).
45. Kneipp, J., Kneipp, H. & Kneipp, K. SERS--a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1052–1060 (2008).
46. Abalde-Cela, S., Carregal-Romero, S., Coelho, J. P. & Guerrero-Martínez, A. Recent progress on colloidal metal nanoparticles as signal enhancers in nanosensing. *Adv. Colloid Interface Sci.* **233**, 255–270 (2016).
47. Osawa, M. Surface-Enhanced Infrared Absorption. *Near-f. Opt. Surf. Plasmon Polaritons* 163–187 (2006).
48. Austin, L. A., MacKey, M. A., Dreaden, E. C. & El-Sayed, M. A. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles

- in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch. Toxicol.* **88**, 1391–1417 (2014).
49. Aslan, K. *et al.* Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 55–62 (2005).
 50. Jue, T. *Biomedical applications of biophysics*. (Humana, 2010).
 51. Ramos, J., Taylor, D. & Rege, K. Gold Nanoparticle Mediated Photo-Chemotherapy. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **3**, 9 (2012).
 52. Abadeer, N. S. & Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**, 4691–4716 (2016).
 53. Verma, J., Lal, S. & Van Noorden, C. J. F. Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 2863–77 (2014).
 54. Polte, J. Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles - a new Perspective. *CrystEngComm* **17**, 6809–6830 (2015).
 55. Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C. & Lead, J. R. Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 7011–7017 (2012).
 56. Jiang, X. C., Chen, W. M., Chen, C. Y., Xiong, S. X. & Yu, A. B. Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach. *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 1–9 (2010).
 57. Patra, J. K. & Baek, K.-H. Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *J. Nanomater.* **2014**, 1–12 (2014).
 58. Olmos-Asar, J. A., Ludueña, M. & Mariscal, M. M. Monolayer protected gold nanoparticles: the effect of the headgroup–Au interaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 15979 (2014).
 59. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
 60. Gao, J., Huang, X., Liu, H., Zan, F. & Ren, J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir* **28**, 4464–4471 (2012).
 61. Wu, L., Zhang, J. & Watanabe, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 456–469 (2011).
 62. Onoue, S., Yamada, S. & Chan, K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 1025 (2014).
 63. Qie, Y. *et al.* Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci. Rep.* **6**, 26269 (2016).

64. Sabella, S. *et al.* A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **6**, 7052 (2014).
65. Chompoosor, A. *et al.* The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small* **6**, 2246–2249 (2010).
66. Petlevski, R. & Pavic, I. Comparison of In Vitro Toxicity of Silver Ions and Silver Nanoparticles on Human Hepatoma Cells. 1–14 (2014).
67. Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A. & Santos, C. A. Dos. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* **0**, 1–24 (2015).
68. Rivera Gil, P., Hühn, D., del Mercato, L. L., Sasse, D. & Parak, W. J. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol. Res.* **62**, 115–125 (2010).
69. Choi, H. S. *et al.* Tissue- and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots. *Nano Lett.* **9**, 2354–9 (2009).
70. Soenen, S. J. *et al.* Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* **6**, 446–465 (2011).
71. Galceran, J. *et al.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin. Transl. Oncol.* (2017).
72. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
73. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
74. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **66**, 7–30 (2016).
75. Hashizume, H. *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**, 1363–1380 (2000).
76. Iwai, K., Maeda, H. & Konno, T. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumour: Enhanced therapeutic effect and X-ray image. *Cancer Res.* **44**, 2114–2121 (1984).
77. Konno, T. *et al.* Selective targeting of anti-cancer drug and simultaneous image enhancement in solid tumors by arterially administered lipid contrast medium. *Cancer* **54**, 2367–2374 (1984).
78. Leu, A. J., Berk, D. a, Lymboussaki, A., Alitalo, K. & Jain, R. K. Absence of Functional Lymphatics within a Murine Sarcoma: A Molecular and Functional Evaluation Advances in Brief Absence of Functional Lymphatics within a Murine Sarcoma: A Molecular and Functional Evaluation 1. *Cancer Res.* 4324–4327 (2000).
79. Jeon, B. H. *et al.* Profound but dysfunctional lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor ligands from CD11b+ macrophages in advanced ovarian cancer. *Cancer Res.* **68**, 1100–1109 (2008).

80. Taurin, S., Nehoff, H. & Greish, K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *J. Control. Release* **164**, 265–275 (2012).
81. Netti, P. A. *et al.* Enhancement of fluid filtration across tumor vessels: implication for delivery of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3137–3142 (1999).
82. Padera, T. P. *et al.* Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* **427**, 695 (2004).
83. Sarin, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* **2**, 1–19 (2010).
84. Horn, T., Henriksen, J. & Christoffersen, P. The sinusoidal lining cells in ‘normal’ human liver. A scanning electron microscopic investigation. *Liver* **6**, 98–110 (1986).
85. Decuzzi, P. *et al.* Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release* **141**, 320–327 (2010).
86. Huang, L. & Guo, S. Nanoparticles escaping RES and endosome: Challenges for siRNA delivery for cancer therapy. *J. Nanomater.* **2011**, (2011).
87. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept : 100 years of progress. *Nat. Rev. cancer* **8**, 473–480 (2008).
88. Zaczek, A., Brandt, B. & Bielawski, K. P. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol. Histopathol.* **20**, 1005–1015 (2005).
89. Gao, J. *et al.* Polymer–lipid hybrid nanoparticles conjugated with anti-EGF receptor antibody for targeted drug delivery to hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine* **9**, 279–293 (2014).
90. Dawidczyk, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release* **187**, 133–144 (2014).
91. Dawidczyk, C. M., Russell, L. M. & Searson, P. C. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Front. Chem.* **2**, 69 (2014).
92. Kumar, A., Kim, S. & Nam, J. M. Plasmonically Engineered Nanoprobes for Biomedical Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 14509–14525 (2016).
93. Cao, Y. *et al.* Syntheses and Characterization of Nearly Monodispersed, Size-Tunable Silver Nanoparticles over a Wide Size Range of 7–200 nm by Tannic Acid Reduction. *Langmuir* **30**, 3876–3882 (2014).
94. Pietro, P. Di, Strano, G. & Satriano, L. Z. and C. Gold and Silver Nanoparticles for Applications in Theranostics. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **16**, 3069–3102 (2016).

95. Wei, L. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **20**, 595–601 (2015).
96. Rycenga, M., Cobley, C. M., Zeng, J., Li, W. & Moran, C. H. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem Rev* **111**, 3669–3712 (2012).
97. Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W. & Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1534 (2016).
98. Arvizo, R. R. *et al.* Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2943 (2012).
99. Doria, G. *et al.* Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* **12**, 1657–1687 (2012).
100. Azzazy, H. M. E., Mansour, M. M. H., Samir, T. M. & Franco, R. Gold nanoparticles in the clinical laboratory: Principles of preparation and applications. *Clin. Chem. Lab. Med.* **50**, 193–209 (2012).
101. Montes-García, V., Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I. & Liz-Marzán, L. M. Metal Nanoparticles and Supramolecular Macrocycles: A Tale of Synergy. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 10874–10883 (2014).
102. Comenge, J. *et al.* Preventing Plasmon Coupling between Gold Nanorods Improves the Sensitivity of Photoacoustic Detection of Labeled Stem Cells in Vivo. *ACS Nano* **10**, 7106–7116 (2016).
103. Mahmoudi, M. *et al.* Raman active jagged-shaped gold-coated magnetic particles as a novel multimodal nanoprobe. *Chem. Commun.* **47**, 10404–10406 (2011).
104. Mirza, A. Z. & Shamshad, H. Preparation and characterization of doxorubicin functionalized gold nanoparticles. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 1857–1860 (2011).
105. Ghosh, P. S. *et al.* Nanoparticles featuring amino acid-functionalized side chains as DNA receptors. *Chem. Biol. Drug Des.* **70**, 13–18 (2007).
106. Lee, S. H., Bae, K. H., Kim, S. H., Lee, K. R. & Park, T. G. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *Int. J. Pharm.* **364**, 94–101 (2008).
107. Fernandez-Montesions, R. *et al.* Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles. *Medicine (Baltimore)*. **4**, 919–930 (2009).
108. Kardys, A., Bharali, D. & Mousa, S. Amino-functionalized silica nanoparticles: in vitro evaluation for targeted delivery and therapy of pancreatic cancer. *J. Nanotechnol.* **2013**, (2013).
109. Bhattacharjee, Y. & Chakraborty, A. Label-free cysteamine-capped silver nanoparticle-

- based colorimetric assay for Hg(II) detection in water with subnanomolar exactitude. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 2149–2154 (2014).
110. Wang, L. *et al.* Facile, green and clean one-step synthesis of carbon dots from wool: Application as a sensor for glyphosate detection based on the inner filter effect. *Talanta* **160**, 268–275 (2016).
 111. Besouw, M., Masereeuw, R., Van Den Heuvel, L. & Levtchenko, E. Cysteamine: An old drug with new potential. *Drug Discov. Today* **18**, 785–792 (2013).
 112. Wu, J. *et al.* A gold nanoparticle platform for the delivery of functional TGF- β 1 siRNA into cancer cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **12**, 800–810 (2016).
 113. Yu, F. *et al.* Glutathione-responsive multilayer coated gold nanoparticles for targeted gene delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* **12**, 503–515 (2016).
 114. Telli, F. C. *et al.* Novel glyconanoconjugates: synthesis, characterization and bioapplications. *RSC Adv.* **6**, 105806–105813 (2016).
 115. Castilho, M. L., Hewitt, K. C. & Raniero, L. FT-IR characterization of a theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. *Sensors Actuators B Chem.* **240**, 903–908 (2017).
 116. Rahman, M. A. *et al.* Systemic delivery of siRNA nanoparticles targeting RRM2 suppresses head and neck tumor growth. *J. Control. Release* **159**, 384–392 (2012).
 117. Wu, C. *et al.* Enhanced in vitro anticancer activity of quercetin mediated by functionalized CdTe QDs. *Sci. China Chem.* **57**, 1579–1588 (2014).
 118. Pandey, S. *et al.* Gold nanorods mediated controlled release of doxorubicin: Nano-needles for efficient drug delivery. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1671–1681 (2013).
 119. Ghosh, R., Singh, L. C., Shohet, J. M. & Gunaratne, P. H. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. *Biomaterials* **34**, 807–816 (2013).
 120. Wu, C. *et al.* New strategy of efficient inhibition of cancer cells by carborane carboxylic acid-CdTe nanocomposites. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **8**, 860–869 (2012).
 121. Soares, J. C. *et al.* Supramolecular Control in Nanostructured Film Architectures for Detecting Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11833–11841 (2015).
 122. Canbaz, M. C., Şimşek, C. S. & Sezgintürk, M. K. Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayers modified with gold nanoparticles for detection of HER-3. *Anal. Chim. Acta* **814**, 31–38 (2014).
 123. Xu, P. *et al.* Synergetic effect of functional cadmium-tellurium quantum dots conjugated with gambogic acid for HepG2 cell-labeling and proliferation inhibition. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 3729–3736 (2013).

124. Jv, Y., Li, B. & Cao, R. Positively-charged gold nanoparticles as peroxidase mimic and their application in hydrogen peroxide and glucose detection. *Chem. Commun.* **46**, 8017–8019 (2010).
125. Sharma, A. *et al.* Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. *Thin Solid Films* **519**, 1213–1218 (2010).
126. Jiang, X., Yang, M., Meng, Y., Jiang, W. & Zhan, J. Cysteamine-modified silver nanoparticle aggregates for quantitative sensing of pentachlorophenol with a portable Raman spectrometer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 6902–6908 (2013).
127. Luo, Y. *et al.* A novel colorimetric aptasensor using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk. *Food Control* **54**, 7–15 (2015).
128. Ren, S., Zhou, F., Xu, C. & Li, B. Simple method for visual detection of glutathione S-transferase activity and inhibition using cysteamine-capped gold nanoparticles as colorimetric probes. *Gold Bull.* **48**, 147–152 (2015).
129. Agoston, R. *et al.* Rapid isolation and detection of erythropoietin in blood plasma by magnetic core gold nanoparticles and portable Raman spectroscopy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 633–641 (2016).
130. Watanabe, H., Kamikawa, M., Nakagawa, Y., Takahashi, T. & Ito, A. The effects of ranitidine and cysteamine on intestinal metaplasia induced by X-irradiation in rats. *Pathol. Int.* **38**, 1285–1296 (1988).
131. Glembocki, O. J. *et al.* Cysteamine Coated Ag and Au nanorods for Improved Surface Enhanced Raman Scattering from dinitrotoluene and trinitrotoluene. *SPIE Nanosci. + Eng.* **7757**, 77570I–77570I–9 (2010).
132. Inano, H., Onoda, M., Suzuki, K., Kobayashi, H. & Wakabayashi, K. Inhibitory Effects of WR-2721 and Cysteamine on Tumor Initiation in Mammary Glands of Pregnant Rats by Radiation. *Radiat. Res.* **153**, 68–74 (2000).
133. Tatsuta, M. *et al.* Inhibitory effect of prolonged administration of cysteamine on experimental carcinogenesis in rat stomach induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int. J. Cancer* **41**, 423–426 (1988).
134. Jeitner, T. M. & Renton, F. J. Inhibition of the proliferation of human neural neoplastic cell lines by cysteamine. *Cancer Lett.* **103**, 85–90 (2016).
135. Fujisawa, T. *et al.* Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer. *PLoS One* **7**, (2012).
136. Wan, X.-M. *et al.* Autophagy-mediated chemosensitization by cysteamine in cancer cells. *Int. J. Cancer* **129**, 1087–1095 (2011).
137. Unak, G. *et al.* Gold nanoparticle probes: Design and in vitro applications in cancer cell

- culture. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **90**, 217–226 (2012).
138. Pan, Y.-T. *et al.* Functionalized ultrathin palladium nanosheets as patches for HepG2 cancer cells. *Chem. Commun.* **51**, 14171–14174 (2015).
 139. Zheng, Y. *et al.* FePt nanoparticles as a potential X-ray activated chemotherapy agent for HeLa cells. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 6435–6444 (2015).
 140. Ma, L., Zou, X. & Chen, W. A new x-ray activated nanoparticle photosensitizer for cancer treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 1501–1508 (2014).
 141. Yao, M. *et al.* A new modality for cancer treatment-nanoparticle mediated microwave induced photodynamic therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **12**, 1835–1851 (2016).
 142. Ong, C. *et al.* Silver Nanoparticles in Cancer: Therapeutic Efficacy and Toxicity. *Curr. Med. Chem.* **20**, 772–781 (2013).
 143. Michota, A., Kudelski, A. & Bukowska, J. Molecular structure of cysteamine monolayers on silver and gold substrates - Comparative studies by surface-enhanced Raman scattering. *Surf. Sci.* **502–503**, 214–218 (2002).
 144. Bayram, S., Zahr, O. K. & Blum, A. S. Short ligands offer long-term water stability and plasmon tunability for silver nanoparticles. *RSC Adv.* **5**, 6553–6559 (2015).
 145. Lee, S. Y., Noh, J., Hara, M. & Lee, H. An STM Study on Solvent Effects in Forming Self-Assembled Cysteamine and Propanethiol Monolayers on Au (111). *Mol. Cryst.* **377**, 37–41 (2002).
 146. Yiu, H. H. P. *et al.* Comprehensive study of DNA binding on iron(II,III) oxide nanoparticles with a positively charged polyamine three-dimensional coating. *Langmuir* **29**, 11354–11365 (2013).
 147. Laban, B. *et al.* Mechanism and kinetics of J-aggregation of thiocyanine dye in the presence of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **118**, 23393–23401 (2014).
 148. Castillo, P. M. *et al.* Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine* **3**, 627–635 (2008).
 149. Lee, S. Y., Noh, J., Hara, M. & Lee, H. An STM Study on Solvent Effects in Forming Self-Assembled Cysteamine and Propanethiol Monolayers on Au(111). *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **377**, 177–180 (2002).
 150. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16 (2006).
 151. Goffin, J. R. & Zbuk, K. Epidermal Growth Factor Receptor: Pathway, Therapies, and Pipeline. *Clin. Ther.* **35**, 1282–1303 (2016).
 152. Roskoski Jr., R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* **79**, 34–74 (2014).

153. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S. & Misra, A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials* **34**, 8690–8707 (2013).
154. Fernandez-Montesinos, R. *et al.* Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. **4**, 919–930 (2009).
155. Aguilera, J. R. *et al.* Targeted multifunctional tannic acid nanoparticles. *RSC Adv.* (2016).
156. de Lima, R., Seabra, A. B. & Durán, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **32**, 867–879 (2012).
157. Chompoosor, A. *et al.* The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small* **6**, 2246–2249 (2010).
158. Mozafari, M. R. *et al.* Role of nanocarrier systems in cancer nanotherapy. *J. Liposome Res.* **19**, 310–321 (2009).
159. Ediriwickrema, A. & Saltzman, W. M. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**, 64–78 (2015).
160. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. & Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1310–1316 (2008).
161. Banerjee, D. & Sengupta, S. Nanoparticles in cancer chemotherapy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **104**, 489–507 (2011).
162. Celma, G. & Marsa, S. Biotinylated polyurethane-urea nanoparticles for targeted theranostics in human hepatocellular carcinoma. **8**, 1729–1745 (2015).
163. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1307–15 (2008).
164. Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1759–1782 (2009).
165. Radwan, S. H. Gold nanoparticles for molecular diagnostics. **9**, 511–524 (2009).
166. Morral-Ru??z, G., Melgar-Lesmes, P., Solans, C. & Garc??a-Celma, M. J. Multifunctional polyurethane-urea nanoparticles to target and arrest inflamed vascular environment: A potential tool for cancer therapy and diagnosis. *J. Control. Release* **171**, 163–171 (2013).
167. Wang, S. *et al.* Multifunctional biodegradable polyacrylamide nanocarriers for cancer theranostics-A ‘see and treat’ strategy. *ACS Nano* **6**, 6843–6851 (2012).

168. Tauran, Y., Brioude, A., Coleman, A. W., Rhimi, M. & Kim, B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J. Biol. Chem.* **4**, 35–63 (2013).
169. 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.* *Chemical Reviews* **105**, (2005).
170. Lagoja, I. M. Pyrimidine as constituent of natural biologically active compounds. *Chem. Biodivers.* **2**, 1–50 (2005).
171. Jain, K. S. *et al.* Biological and medicinal significance of pyrimidines. *Curr. Sci.* **90**, 793–803 (2006).
172. Hadjikakou, S., Demertzis, M. A., Kubicki, M. & Kovala-demertzi, D. Organotin adducts with pyrimidinethione : crystal structure of dimethyldi (pyrimidine-2- thiolato) tin (IV) and diphenyldi (pyrimidine-2- thiolato) tin (IV). **734**, 727–734 (2000).
173. Zhao, Y. *et al.* Small-Molecule Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents that Target Gram-negative Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12349–12356 (2010).
174. Arruebo, M., Valladares, M. & González-Fernández, Á. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *J. Nanomater.* **2009**, (2009).
175. Vashist, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* **2**, 23–33 (2012).
176. Master, A. M. & Sen Gupta, A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine (Lond).* **7**, 1895–906 (2012).
177. Hermanson, G. T. Preparation of colloidal-gold-labeled proteins. *Bioconjugate Tech.* **14**, (1996).
178. Sokolov, K. *et al.* Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles Advances in Brief Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conj. *Adv. Br.* 1999–2004 (2004).
179. Brand, T. M., Iida, M. & Wheeler, D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 777–792 (2011).
180. Giljohann, D. A. *et al.* Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3280–3294 (2010).
181. Kay, M. A., Glorioso, J. C. & Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* **7**, 33–40 (2001).
182. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**, 346–358 (2003).

183. Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y. & He, N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics* **4**, 240–255 (2014).
184. Ghosh, P. S., Kim, C., Han, G., Forbes, N. S. & Rotello, V. M. Efficient Gene Delivery Vectors by Tuning the Surface Charge Density of. *J. Am. Chem. Soc.* **2**, 2213–2218 (2008).
185. Ding, Y. *et al.* Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol. Ther.* **22**, 1075–83 (2014).
186. Castillo, P. M. *et al.* Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine (Lond)*. **3**, 627–35 (2008).
187. Link, S. & El-Sayed, M. a. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212 (1999).
188. Clogston, Jeffrey D., P. A. K. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug delivery* (ed. McNeil, S. E.) 63–70 (Humana Press, 2011).
189. Morral-Ruíz, G., Solans, C., García, M. L. & García-Celma, M. J. Formation of pegylated polyurethane and lysine-coated polyurea nanoparticles obtained from O/W nano-emulsions. *Langmuir* **28**, 6256–6264 (2012).
190. Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J. & Mousa, S. a. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **4**, 273–282 (2008).
191. Nghiem, T. H. L. *et al.* Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **1**, 25009 (2010).
192. Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M. & Lee, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. **6**, 929–941 (2011).
193. Yang, J., Lee, Y., Deivaraj, T. C. & Too, H. Single Stranded DNA Induced Assembly of Gold Nanoparticles. (1936).
194. Klasen, H. . A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**, 131–138 (2000).
195. Melaiye, A. & Youngs, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin. Ther. Pat.* **15**, 125–130 (2005).
196. Dos Santos, C. A. *et al.* Silver nanoparticles: Therapeutic uses, toxicity, and safety issues. *J. Pharm. Sci.* **103**, 1931–1944 (2014).
197. Langer, J., Novikov, S. M. & Liz-Marzán, L. M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. *Nanotechnology* **26**, 322001 (2015).
198. Mukherjee, S. G. *et al.* Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicol. Vitro.* **26**, 238–251 (2012).

199. Park, M. V. D. Z. *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity , inflammation , developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 9810–9817 (2011).
200. Crozier, A., Jaganath, I. B. & Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1001 (2009).
201. Chen, X. *et al.* Tannic acid is an inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with antiangiogenic activity. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3115–23 (2003).
202. Sahiner, N., Sagbas, S. & Aktas, N. Single step natural poly(tannic acid) particle preparation as multitalented biomaterial. *Mater. Sci. Eng. C* **49**, 824–834 (2015).
203. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M. & Aboul-Enein, H. Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab. J. Chem.* **3**, 43–53 (2010).
204. Buzzini, P. *et al.* Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Reviews Med. Chem.* **8**, 1179–1187 (2008).
205. Khan, N. S., Ahmad, A. & Hadi, S. . Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem. Biol. Interact.* **125**, 177–189 (2000).
206. Bouki, E., Dimitriadis, V. K., Kaloyianni, M. & Dailianis, S. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* **85**, 13–20 (2013).
207. Majed, F. *et al.* Tannic acid mitigates the DMBA/croton oil-induced skin cancer progression in mice. *Mol. Cell. Biochem.* **399**, 217–228 (2015).
208. Katzenellenbogen, M. *et al.* Molecular Mechanisms of Liver Carcinogenesis in the Mdr2-Knockout Mice. *Mol. Cancer Res.* **5**, 1159–1170 (2007).
209. Chen, C.-H. *et al.* The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 962–968 (2007).
210. Chang, T.-L. & Wang, C.-H. Combination of quercetin and tannic acid in inhibiting 26S proteasome affects S5a and 20S expression, and accumulation of ubiquitin resulted in apoptosis in cancer chemoprevention. *Biol. Chem.* **394**, 561–575 (2013).
211. Chen, K.-S. *et al.* Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leuk. Res.* **33**, 297–307 (2009).
212. Booth, B. W. *et al.* Tannic Acid Preferentially Targets Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer* **2013**, 1–9 (2013).
213. Ngobili, T. A. *et al.* Remodeling of tannic acid crosslinked collagen type I induces apoptosis in ER+ breast cancer cells. *Anticancer Res.* **35**, 1285–90 (2015).
214. Cichocki, M., Datek, M., Szamałek, M. & Baer-Dubowska, W. Naturally Occurring Phenolic Acids Modulate TPA-induced Activation of EGFR, AP-1, and STATs in Mouse

- Epidermis. *Nutr. Cancer* **66**, 308–314 (2014).
215. Noordeen, S., Karthikeyan, K. & Parveen, M. a N. Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent. *Int. J. Eng. Res. Technol.* **2**, 388–397 (2013).
216. Sivaraman, S. K. & Elango, I. RESEARCH COMMUNICATIONS A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *October* **97**, 1055–1059 (2009).
217. Dadosh, T. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Mater. Lett.* **63**, 2236–2238 (2009).
218. Ahmad, T. Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles. *Hindawi Publishing Corp.* **2014**, 1–18 (2014).
219. Orłowski, P. *et al.* Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS One* **9**, 1–15 (2014).
220. Cheng, Y., Wang, F., Fang, C., Su, J. & Yang, L. Preparation and characterization of size and morphology controllable silver nanoparticles by citrate and tannic acid combined reduction at a low temperature. *J. Alloys Compd.* **658**, 684–688 (2016).
221. Aswathy Aromal, S. & Philip, D. Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis. *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* **44**, 1692–1696 (2012).
222. Philip, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **71**, 80–85 (2008).
223. Alshammari, A., Köckritz, A., Kalevaru, V. N., Bagabas, A. & Martin, A. Influence of Single Use and Combination of Reductants on the Size, Morphology and Growth Steps of Gold Nanoparticles in Colloidal Mixture. *Open J. Phys. Chem.* **2**, 252–261 (2012).
224. Cataldo, F., Ursini, O. & Angelini, G. A green synthesis of colloidal silver NP and their reaction with ozone. *Sect. B-Research Pap. Exp.* **2**, 700–705 (2013).
225. Romani Ojeda, J. Pontificia universidad católica del Perú. (2012).
226. Pulaski, B. a & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 20**, Unit 20.2 (2001).
227. Aguilera, J. R. *et al.* Targeted multifunctional tannic acid nanoparticles. *RSC Adv.* **6**, 7279–7287 (2016).

Anexo 1

PROCEDIMIENTO POST-SÍNTESIS DE MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDOS DE HIERRO

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro con grupos hidroxilo, a las nanopartículas de superficie modificada obtenidas por el mismo, así como el uso de estas nanopartículas de superficie modificada en terapia, diagnóstico y en técnicas de concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

A lo largo de la última década las nanopartículas de óxidos de hierro han despertado un gran interés en diferentes ámbitos tecnológicos, especialmente en biomedicina, debido a sus propiedades superparamagnéticas. El superparamagnetismo es un comportamiento magnético que exhibe algunas características del ferromagnetismo y otras del paramagnetismo, y se produce al reducir el tamaño de un material ferromagnético a la escala nanométrica. La reducción del tamaño hace que las interacciones ferromagnéticas en el interior del nanomaterial sean suficientemente intensas como para lograr un ordenamiento magnético por debajo de cierta temperatura crítica, pero con interacciones muy débiles entre ellas, por lo que el ordenamiento magnético no puede extenderse a todo el sistema. El resultado es que se comportan como paramagnetos, pero con un momento magnético muy superior al de las sustancias paramagnéticas, por lo que reciben el nombre de superparamagnetos.

Entre las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPION) cabe destacar su uso como agentes de contraste en

Resonancia Magnética de Imagen (MRI) para la diagnosis del cáncer de hígado y metástasis hepáticas [ZR. Stephen, FM. Kievit and M Zhang. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Mater Today* (Kidlington). 2011; 14(7-8): 330-338]. Para su uso en MRI las nanopartículas SPION se recubren con polímeros tales como, por ejemplo, dextrano o carboxidextrano. Su pequeño tamaño y la naturaleza del recubrimiento hacen que puedan ser endocitadas por las células de Kupffer (macrófagos situados en el hígado). Los gradientes de campo magnético inducidos por SPION amplifican las señales de MRI de los protones que se encuentran en su vecindad y, puesto que los tumores malignos de hígado no poseen macrófagos de Kupffer, no retienen SPION, haciendo que aumente el contraste en las imágenes de MRI y se puedan detectar tumores de tamaño muy pequeño. SPION son biodegradables, ya que se metabolizan pasando a formar parte de los almacenes de hierro del cuerpo e integrándose a la hemoglobina, y su uso clínico ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* para la detección de tumores hepáticos, existiendo actualmente numerosas formulaciones comerciales (Endorem®, Fedirex®, Lumirem®, Resovist®, Sinerem®, Combidex®). La aplicabilidad de las nanopartículas superparamagnéticas en diagnosis no se limita a la MRI, y recientemente se ha desarrollado una nueva metodología de imagen denominada de Partícula Magnética (MPI), que está demostrando un enorme potencial en diagnosis [Gleich, B.; Weizenecker, J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* 2005, 435, 1214-1217] [Du, Y.; Lai, P.T.; Leung, C.H.; Pong, P.W.T. Design of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging (MPI). *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 18682-18710.].

Además de en diagnosis, SPION también poseen aplicaciones terapéuticas, entre las que destaca su uso en la terapia antitumoral por hipertermia. Esta terapia consiste en dirigir las nanopartículas al tejido tumoral a tratar, ya sea por direccionamiento activo o pasivo, y someter al paciente a un campo magnético alterno. Este campo magnético provocará el calentamiento de las nanopartículas y estas, al disipar el calor, elevarán localmente la temperatura en el tejido tumoral en el que se encuentran. Un aumento de 5-6 °C sobre la temperatura corporal hará que las células entren en apoptosis, destruyéndose el tumor. La eficacia de esta terapia se puede aumentar conjugando las nanopartículas a un agente quimioterapéutico convencional [M Torres-Lugo and C Rinaldi. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*

2013, 8(19), 1689-1707]. Tanto en aplicaciones de diagnosis como terapéuticas es necesario que las nanopartículas posean un recubrimiento que las haga estables en medios biológicos, y que permita su unión a moléculas o biomoléculas con actividad antitumoral [Forrest M. Kievit And Miqin Zhang. Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. Accounts of Chemical Research. 2011,44(10), 853-862].

Otra importante aplicación de estas nanopartículas es su uso en procesos de separación y concentración de muestras, tanto en aplicaciones biomédicas como medioambientales. El fundamento de estas técnicas de separación/concentración reside, de nuevo, en las propiedades magnéticas de las nanopartículas, que hacen posible que estas se puedan separar del medio en el que se encuentran por la acción de un imán, arrastrando con ellas aquellas especies químicas que se adsorban a su superficie. Los procesos de separación requieren que la superficie de las nanopartículas esté recubierta por un ligando que posea afinidad por la especie que se desea separar. Esta tecnología, además de permitir separar especies químicas (tales como, por ejemplo, compuestos orgánicos e inorgánicos, biomoléculas o iones metálicos), también permite separar microorganismos y células [Tang Yan, Chu LinYa, Sun Ning, Liu RenXiao, Ge GuangLu. Research progress in magnetic separation with iron oxide magnetic nanoparticles. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(24): 2377-2384]. Actualmente existen casas comerciales que comercializan micropartículas (microbeads) magnéticas para aplicaciones de separación. Frente a las microbeads las nanopartículas tienen la ventaja de poseer una mayor relación superficie/volumen (de 100 a 1000 veces mayor), por lo que un determinado peso de nanopartículas puede unir una mayor cantidad del ligando (generalmente anticuerpos) que interacciona con la especie a separar, que la misma cantidad de microbeads, aumentando la eficiencia de la separación.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro pueden sintetizarse mediante diferentes métodos, que favorecen la producción de nanopartículas de distinto tamaño y forma. Artículos de revisión recientes, como el de Laurent et al [Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, and Robert N. Muller. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2064-2110] o el de Reddy et al [L. Harivardhan Reddy, José L.

Arias, Julien Nicolas, and Patrick Couvreur. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. Chem. Rev. 2012, 112, 5818-5878] proporcionan una perspectiva amplia y completa del actual estado de la técnica en lo que a síntesis y modificaciones superficiales de las nanopartículas se refiere. Independientemente del método de síntesis elegido, la complejidad del procedimiento radica en lograr un estricto control del tamaño estableciendo unas condiciones experimentales óptimas. Entre los métodos de síntesis disponibles el más utilizado por su sencillez, eficiencia y bajo coste es el denominado método de Massart o método de *co-precipitación*, que consiste en hacer precipitar en medio acuoso básico o ácido dos sales de hierro (una férrica y otra ferrosa).

Con respecto a la superficie de las nanopartículas su modificación se puede llevar a cabo tanto durante la síntesis como en un procedimiento post-síntesis. Como hemos mencionado en párrafos anteriores, las modificaciones de la superficie cumplen dos funciones, por un lado aportan estabilidad al sistema coloidal en el medio dispersante y, por otro, aportan grupos funcionales en superficie que permiten conjugarlas a moléculas o biomoléculas necesarias en la aplicación concreta a la que están destinadas. Uno de los métodos más habituales de modificación, que se puede realizar bien durante la síntesis bien en un procedimiento post-síntesis, consiste en tratar las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con moléculas orgánicas portadoras de grupos carboxilato, fosfato o sulfato, ya que estos grupos poseen afinidad por la superficie de las nanopartículas y se adsorben a ella. Estas moléculas, que actúan como espaciadores químicos, deben poseer, además de un grupo con afinidad por la superficie de las nanopartículas, otros grupos funcionales que aporten estabilidad en medio acuoso y permitan la posterior funcionalización de las nanopartículas con moléculas o biomoléculas de interés. En aplicaciones biomédicas el espaciador debe ser biocompatible, lo que limita el número de espaciadores disponibles.

Otra estrategia muy utilizada consiste en recubrir las nanopartículas con polímeros. Este recubrimiento puede comprometer la biocompatibilidad de las nanopartículas haciéndolas inadecuadas para aplicaciones biomédicas, por lo que el polímero se debe seleccionar de un grupo restringido de polímeros biocompatibles y biodegradables. Por otra parte, la comparación entre el número de grupos funcionales que aporta un

polímero para unir ligandos (generalmente limitado a los dos grupos funcionales terminales) y su elevado volumen proporciona una relación muy poco eficiente y, aunque la nanopartícula esté totalmente recubierta por polímeros, su superficie reactiva será baja.

Otras estrategias de funcionalización consisten en recubrir las nanopartículas con otro material, como grafito, oro u óxido de silicio, para unir a esta capa externa moléculas orgánicas que aporten los grupos funcionales necesarios para unir el ligando. Estas estrategias poseen varias desventajas: comprometen la biocompatibilidad, introducen dos pasos adicionales a la síntesis y, si la funcionalización no recubre totalmente la superficie se pueden producir uniones inespecíficas a esta, disminuyendo la selectividad en aplicaciones de separación.

Por último, algunos métodos de síntesis en medio acuoso dan lugar a grupos OH en superficie. Por ejemplo, la síntesis de magnetita por coprecipitación de sales de hierro en medio básico origina algunos sitios Fe-OH en la superficie de la nanopartículas [E. Tombácz, A. Majzik, Zs. Horvát, E. Illés. Magnetite in aqueous medium: coating its surface and surface coated with it. *Roman. Rep. Physics*, 2006, 58(3), 281-286]. No obstante, el examen de los espectros de IR de estas nanopartículas disponibles en la bibliografía, ponen de manifiesto que el área de la banda debida a la presencia de grupos hidroxilo es muy inferior a las bandas características de la magnetita, por lo que la prevalencia de grupos OH es muy limitada y, en cualquier caso, insuficiente para asegurar una correcta funcionalización.

Teniendo en cuenta los factores limitantes expuestos, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento sencillo, que permita obtener nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro de pequeño tamaño, monodispersas y con un elevado recubrimiento superficial, preferentemente un grupo funcional directamente unido a la superficie de las nanopartículas, que les aporte estabilidad y versatilidad en diferentes aplicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o una combinación de las mismas, cuyas superficies están funcionalizadas directamente con grupos hidroxilo. Los grupos hidroxilos están unidos directamente a la superficie, es decir, estos grupos hidroxilos no requieren de espaciadores orgánicos o inorgánicos para unirse a las nanopartículas.

Además, los grupos hidroxilos unidos directamente a la superficie permiten su posterior funcionalización con moléculas o biomoléculas de interés, bien mediante la formación de enlaces covalentes bien mediante conjugación.

De acuerdo a su composición química tanto el núcleo de las nanopartículas superparamagnéticas como su recubrimiento tienen una gran estabilidad en medio acuoso y/o medio biológico, son biocompatibles y biodegradables y se pueden unir a moléculas y biomoléculas como pueden ser un anticuerpo que sirva de modelo de vector de direccionamiento, un agente antitumoral o un oligonucleótido que sirven como modelos de quimioterapia y terapia génica, entre otros.

Por otro lado, la presente invención se refiere al procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o una combinación de las mismas. Mediante el procedimiento se obtienen nanopartículas superparamagnéticas de pequeño tamaño, monodispersas y con un alto grado de recubrimiento superficial con grupos hidroxilos que permiten la posterior conjugación o unión mediante enlaces covalentes de moléculas y biomoléculas sin que las propiedades superparamagnéticas del núcleo se vean afectadas. Se trata de un procedimiento sencillo y de bajo coste.

Cabe resaltar que el tamaño de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro tras el tratamiento post-síntesis no se ve incrementado significativamente, como ocurre con el uso de espaciadores orgánicos o inorgánicos.

Por último, la presente invención se refiere al uso de estas nanopartículas superparamagnéticas de superficie modificada con grupos hidroxilo y que además pueden comprender moléculas o biomoléculas

unidas o conjugadas a los grupos hidroxilo, como agentes de diagnóstico o de tratamiento, en terapias selectivas, detección temprana y en técnicas de concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

En un primer aspecto, la presente invención reivindica una nanopartícula de óxido de hierro seleccionado de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores (a partir de ahora nanopartículas de la invención).

El diámetro medio de las nanopartículas de óxido de hierro descritas es de entre 1,5 y 35 150 nm, preferiblemente entre 2 y 50, más preferiblemente entre 3 y 30 nm y aún más preferiblemente entre 4 y 20 nm, de acuerdo con su caracterización por microscopía electrónica de transmisión.

La química superficial de las partículas de óxido de hierro es un factor limitante en su aplicabilidad, por lo que es necesario dotarlas de un recubrimiento de calidad, es decir, que proporcione un número elevado de grupos funcionales que aporten las propiedades físico-químicas requeridas, entre ellas la estabilidad coloidal. Uno de estos grupos es el grupo hidroxilo que, además de aportar estabilidad, permite la funcionalización de las nanopartículas. En los procesos de síntesis en medio acuoso de nanopartículas de óxidos de hierro se producen algunos sitios Fe-OH en la superficie, y estos sitios no son suficientes para conferirles estabilidad en medio acuoso, como se pone de manifiesto en el bajo valor de potencia zeta de las nanopartículas. Por ejemplo, nanopartículas de óxido hierro de un tamaño en torno a 8 nm (medido por TEM) sin tratamiento post-síntesis tienen un valor de potencial zeta de 0 a 10 mV en el intervalo de pH de 8 a 6 en el que se desarrollan la mayoría de sus aplicaciones, especialmente las biomédicas. Con estos valores de potencial zeta las partículas no son estables en suspensión acuosa, y agregan alcanzando diámetros hidrodinámicos en los agregados de 800 a 1000 nm.

Se entiende en la presente invención que la calidad del recubrimiento con los grupos hidroxilo es adecuada cuando el potencial zeta es mayor de 20 mV en el intervalo de pH de 8 a 6.

Por todo ello, en una realización preferida la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro de la invención tienen un valor de potencial zeta en medio acuoso a pH 6-8 superior a 20 mV. Preferiblemente entre 25 y 80 mV y aún más preferiblemente entre 30 y 60. Este potencial zeta se alcanza mediante el tratamiento post-síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro objeto de la invención.

En una realización preferida de la invención el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de la invención, resultantes tras el tratamiento post-síntesis, es de entre 4 y 200 nm. Preferiblemente de 6 a 150 nm, y aún más preferiblemente de entre 8 a 100 nm.

1. Otra forma de definir la calidad del recubrimiento con grupos hidroxilo es mediante espectroscopia FTIR. La calidad del recubrimiento es adecuada cuando el espectro de IR de las nanopartículas obtenidas presenta una banda debida a la presencia de grupos hidroxilo (δOH) superior a las bandas características de las nanopartículas ($\nu\text{Fe-O}$) sin pretratar.

En una realización preferida de la invención el valor de la relación de las áreas de las bandas $\delta\text{OH}/\nu\text{Fe-O}$ es superior a 2. Preferiblemente superior a 10, y aún más preferiblemente de entre 10 y 50.

Con estas características descritas se aumenta de forma muy considerable la superficie reactiva de las nanopartículas.

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento post-síntesis de modificación de la superficie de nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquier combinación de las mismas, que comprende las siguientes etapas:

a) adicionar una disolución acuosa de peróxido sobre nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquier combinación de las mismas, y b) opcionalmente, purificar las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

De acuerdo a esta forma de realización se minimiza el proceso, y en un solo paso se obtienen las partículas de interés.

En una realización preferida, el peróxido es peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La disolución acuosa puede incluir, además del peróxido, uno o

varios agentes oxidantes más. En el caso de utilizar una combinación con al menos otro agente oxidante, preferiblemente se trataría de una combinación de peróxido de hidrógeno y al menos otro agente oxidante seleccionado de entre, ácido nítrico, ácido crómico, dicromatos, permanganatos y percloratos.

El agente oxidante se utiliza en el procedimiento en forma de disolución acuosa. Preferiblemente la disolución acuosa es de H_2O_2 y de entre el 10 y el 33% en peso, más preferiblemente entre 20 y 30% en peso.

La adición del agente oxidante debe ser lenta y bajo agitación vigorosa puesto que la reacción es exotérmica.

En otra realización preferida, las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas mediante el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente, se encuentran en forma de suspensión coloidal en un medio dispersante. Preferiblemente el medio dispersante es un disolvente polar.

Más preferiblemente, las nanopartículas de óxido de hierro se encuentran en forma de suspensión coloidal en agua.

Preferiblemente, el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente incluye la etapa b) de purificación de las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

En otra realización preferida, la etapa b) del procedimiento post-síntesis comprende un lavado de las nanopartículas con un disolvente y la separación de las mismas por técnicas de decantación. Preferiblemente, las técnicas de decantación se seleccionan de entre decantación magnética y/o centrifugación y el disolvente para el lavado es preferiblemente un disolvente orgánico, de menor polaridad que el agua, por ejemplo, pero sin limitarse, acetona, etanol, propanol, DMSO; DMF, THF, acetato de Etilo, acetonitrilo o dioxano.

Dependiendo de su posterior uso o adecuación las nanopartículas se pueden purificar para eliminar restos de agente oxidante que puedan interferir en la aplicación.

Por todo ello, en otra realización preferida, las nanopartículas de la invención se encuentran en forma sólida.

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro descritas anteriormente se pueden funcionalizar para utilizar, entre otros, como agentes para el diagnóstico en metodologías de imagen, como en contraste en Resonancia Magnética (MRI) o en otros métodos de imagen como de partícula magnética (MPI). Igualmente serían aptas para aplicaciones terapéuticas. Su recubrimiento estable en medios biológicos y que permite su unión a moléculas o biomoléculas con actividad terapéutica, les hace aptos para esta utilidad. Otro uso para el que claramente están preparadas es para procesos de separación y concentración de muestras, tanto en el campo de la biomedicina como el de aplicaciones medioambientales. Esto es posible tanto por la funcionalización que pueda darse como sobre todo por sus propiedades magnéticas.

Con el fin de poderse utilizar en estas aplicaciones es necesario funcionalizar las nanopartículas de la presente invención.

Por lo que otra realización preferida de la presente invención es que el procedimiento post-síntesis descrito anteriormente incluye la etapa c) de funcionalización de la nanopartícula obtenida en la etapa a) o b).

El paso c) de funcionalización consiste en la presente invención en conjugar a la superficie de las nanopartículas a través de los grupos OH obtenidos en los pasos previos, moléculas o biomoléculas de interés dependiendo de la aplicación final de dichas nanopartículas. Otro aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula funcionalizada. Entendiéndose por nanopartícula funcionalizada aquella que ha sido modificada en su superficie con moléculas confiriéndole nuevas propiedades y/o funcionalidades. Dichas moléculas pueden ser orgánicas o inorgánicas, por ejemplo una biomolécula, un agente terapéutico, un marcador fluorescente, un agente de contraste, organosilanos, un polímero, o un agente complejante.

Ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos son fármacos hidrofóbicos, fármacos hidrofílicos, toxinas y radioisótopos.

Entendiéndose el término "biomolécula" en la presente invención como cualquier compuesto natural o diseñado y/o fabricado por el hombre, que tiene o ejerce un efecto observable en una célula, un componente celular o un organismo. Este término se aplica a las proteínas, los complejos de proteínas que comprenden entidades químicas, el DNA, complejos de

DNA, de RNA, enzimas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, citoquinas, péptidos, receptores, polipéptidos, anticuerpos, antígenos, epítomos antigénicos y variantes de los mismos, vacunas, neurotransmisores, polinucleótidos, hormonas, hidratos de carbono, lípidos, fosfolípidos y sondas marcadas capaces de ser detectadas.

Por ello, en otra una realización preferida, la nanopartícula comprende un anticuerpo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada como agente de diagnóstico. Dependiendo de la funcionalización de la nanopartícula su aplicación en el campo del diagnóstico es muy versátil, pudiéndose utilizar en técnicas de contraste, como en Resonancia Magnética (MRI) o en otros métodos de imagen.

Cuando la funcionalización de la nanopartícula se lleva a cabo con agentes terapéuticos, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada para la elaboración de una composición farmacéutica.

La nanopartícula de la invención puede actuar asimismo como vehículo de liberación sostenida o direccionamiento de fármacos. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la nanopartícula de la invención como vehículo para la liberación controlada de fármacos.

Oro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula funcionalizada o do de la invención.

En la presente invención se entiende por composición farmacéutica una composición que incluya la nanopartícula objeto de la invención. Esta puede estar funcionalizada o no. Por ejemplo, pero sin limitarse, la nanopartícula puede actuar por si sola como agente terapéutico, o estar funcionalizada con una molécula o biomolécula para conseguir que se dirija hacia el foco a tratar, por ejemplo un tumor, o puede ser direccionada por aplicación de una campo magnético. También puede tratarse de una composición farmacéutica donde el papel de la nanopartícula, sea de vehículo de direccionamiento del fármaco o biomolécula que se conjuga.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de la nanopartícula funcionalizada como reactivo en técnicas de concentración y/o separación de muestras químicas y/o biológicas.

Las nanopartículas de la presente invención son especialmente idóneas para este tipo de técnicas puesto que se requiere que la especie a separar o concentrar tenga afinidad por los ligandos de la superficie de las nanopartículas, y la separación será más eficiente cuanto mayor sea el recubrimiento de la nanopartícula con estos ligandos. Como se ha expuesto anteriormente, las nanopartículas de la presente invención, cuya superficie está modificada con grupos hidroxilo, logran un alto grado de funcionalización en superficie, aumentando de esta forma la efectividad en este tipo de aplicaciones.

Otro aspecto se refiere a un kit que comprende las nanopartículas funcionalizadas descritas anteriormente y un sistema magnético de separación.

El último aspecto de la invención se refiere al uso del kit descrito anteriormente para la concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas obtenidas, tras el tratamiento post-síntesis, a diferentes ampliaciones.

FIG. 2. Espectro de infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro antes (gris) y después (negro) del tratamiento.

FIG. 3. Espectro de infrarrojo (FT-IR) de las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro obtenidas tras su funcionalización con (3-Aminopropil)trimetoxisilano.

FIG. 4. Espectro de fluorescencia de la suspensión de nanopartículas obtenida tras su funcionalización con el anticuerpo (negro) y las aguas madre obtenidas por separación magnética de las nanopartículas tras la reacción de acoplamiento (gris).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

1. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (magnetita):

Se mezcla una disolución acuosa de FeCl_2 (12,5 mL, 0,22 M) con una disolución acuosa de FeCl_3 (15 mL, 0,38 M), disolviendo las dos sales con la ayuda de un baño de ultrasonidos.

A continuación se añaden a la mezcla 19 mL de una disolución acuosa de NaOH (6,2 M) bajo agitación y de forma rápida.

Las nanopartículas obtenidas se lavan con agua destilada tres veces y se decantan magnéticamente o por centrifugación.

Tras el último lavado se añaden 20 mL de una disolución acuosa de HNO_3 (2M) bajo agitación vigorosa, y la mezcla se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las nanopartículas se separan por decantación magnética.

2. Tratamiento post-síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro obtenidas en el apartado anterior.

Se resuspenden las nanopartículas obtenidas en el apartado anterior en 20 mL de agua destilada, y se adicionan 40 mL de H₂O₂ (al 30%). La adición debe ser lenta y bajo agitación vigorosa puesto que la reacción es exotérmica.

La mezcla se mantiene 12 horas bajo agitación y, transcurrido este tiempo, se lavan las nanopartículas con acetona y se separan por decantación magnética.

3. Caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro cuya superficie está funcionalizada con grupos hidróxidos obtenidas en el apartado anterior.

Las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 poseen un diámetro medio de 7 nm, de acuerdo a su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (Fig.1), y su diámetro hidrodinámico medio de 35 nm.

La caracterización mediante espectroscopía FT-IR confirma el recubrimiento con grupos hidroxilo en la superficie tras el tratamiento post síntesis (Fig. 2). En el espectro de las nanopartículas antes del tratamiento se observan las bandas características de la magnetita a 614 cm⁻¹ (νFe-O) y a 420 cm⁻¹ (δFe-O). En cambio, tras el tratamiento post-síntesis, las bandas más intensas son las correspondientes a los grupos hidroxilo superficiales, a 1358 cm⁻¹ (δOH) y 3236 cm⁻¹ (νOH), mientras que la banda debida a las nanopartículas, (νFe-O) a 614 cm⁻¹, es prácticamente inapreciable, poniendo de manifiesto el elevado recubrimiento que se logra con el tratamiento post-síntesis. Tras el tratamiento también se observa la aparición de una banda poco intensa a 670 cm⁻¹, que podría deberse a la oxidación superficial de las nanopartículas.

El potencial zeta de las nanopartículas suspendidas en agua a pH 6,5 es de 47,5 mv. Este valor es muy elevado, lo que indica la gran estabilidad de estas nanopartículas en medio acuoso. El signo del potencial es positivo, como cabe esperar de nanopartículas recubiertas de grupos hidroxilo a este pH, por lo que la gran estabilidad observada se debe a repulsiones electrostáticas.

4. Ejemplo de aplicación de las nanopartículas obtenidas.

Ejemplo de aplicación 1. Funcionalización de las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 del ejemplo (MAGOH) con (3-aminopropil)trimetoxisilano (APS).

A 1 mL de una suspensión de MAGOH (1mg/mL en agua:metanol al 50 %) se le añade 1 mL de APS gota a gota en agitación vigorosa, y se mantiene la mezcla en agitación suave durante 12 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizan tres lavados con acetona, separando las nanopartículas mediante decantación magnética.

En el espectro de FT-IR de las nanopartículas obtenidas (Fig. 3) se observan las bandas características del APS: 3064, 1566 y 1335 cm^{-1} (νNH y δNH), 2887 y 2934 cm^{-1} (νCH_2), 1029 cm^{-1} (δSiO). Estas bandas son extremadamente intensas, comparadas con las bandas debidas a las nanopartículas, lo que indica el alto nivel de recubrimiento alcanzado.

Ejemplo de aplicación 2. Funcionalización de las nanopartículas obtenidas en el apartado 2 del ejemplo con el anticuerpo Anti-EGFR marcado con Alexa Flúor. A 1 mL de una suspensión de MAGOH (1mg/mL en agua) se le añade 20 μL de una disolución acuosa de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (0,01M) y 10 μL de una disolución acuosa de N-hidroxisuccinimida (0,02M), y se mantiene la mezcla de reacción en agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se separan las nanopartículas por decantación magnética, se lavan con agua y se resuspenden en 180 μL de una suspensión acuosa conteniendo el anticuerpo. La reacción de acoplamiento con el anticuerpo mantiene a 4°C durante 12 horas en agitación suave. Transcurrido este tiempo se separan las nanopartículas por decantación magnética, se lavan con agua y se resuspenden en 180 μL de agua.

La correcta funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo se comprueba por fluorescencia, comparando la emisión de la suspensión acuosa de las nanopartículas con la de las aguas madre obtenidas por separación magnética tras la reacción de acoplamiento con el anticuerpo (Fig. 4).

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula de óxido de hierro seleccionado de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores, y caracterizadas por un potencial zeta mayor de 20 mV en suspensión acuosa a un pH de 8 a 6.

2. Nanopartícula según la reivindicación 1, que además comprende una biomolécula, un agente terapéutico, un marcador fluorescente, un agente de contraste, un organosilano o un agente complejante.

3. Procedimiento de obtención de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende las siguientes etapas:

a) adicionar una disolución acuosa de peróxido sobre nanopartículas de óxido de hierro seleccionadas de entre magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o cualquiera de sus combinaciones,

b) opcionalmente, purificar las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

4 Procedimiento, según la reivindicación 3, donde el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde el agente oxidante es una combinación de peróxido y otro agente oxidante seleccionado de entre, ácido nítrico, ácido crómico, dicromatos, permanganatos y percloratos.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde se lleva a cabo la etapa b) de purificación de las nanopartículas obtenidas en la etapa a).

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, donde la etapa b) comprende un lavado de las nanopartículas con un disolvente orgánico y la separación de las mismas por técnicas de decantación.

8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 que incluye un paso c) de funcionalización de la nanopartícula obtenida en la etapa a) o b).

9. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la elaboración de una agente diagnóstico.

10. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la elaboración de una composición farmacéutica.

11. Composición farmacéutica que comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

12. Uso de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 como reactivo en técnicas de concentración y/o separación de muestras químicas y/o biológicas.

13. Kit que comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y un sistema magnético.

14. Uso del kit, según reivindicación 13, para la concentración y separación de muestras químicas y biológicas.

Fig. 1

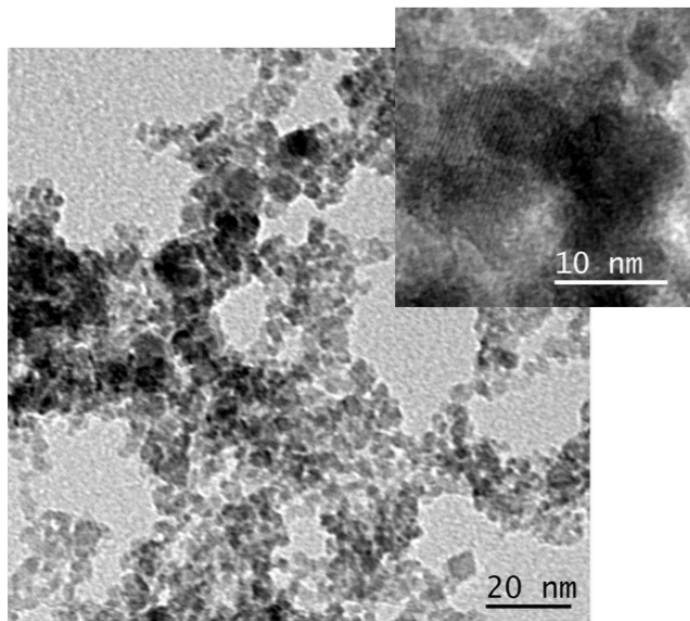


Fig. 2

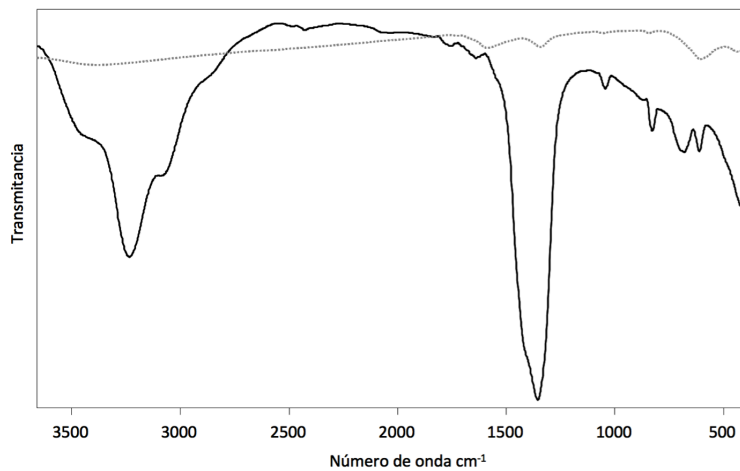


Fig. 3.

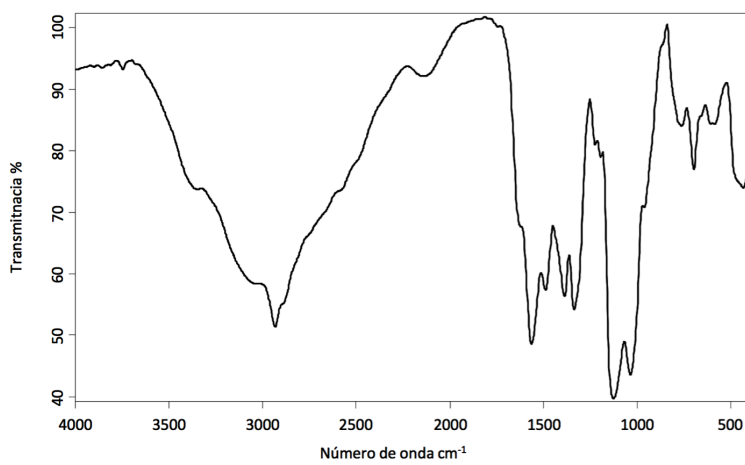
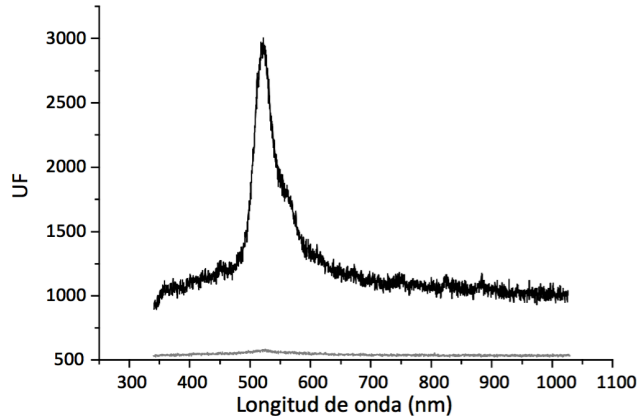


Fig. 4.



OPINIÓN ESCRITA

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
1	CN 101593594 A (UNIV SICHUAN)	02.12.2009
2	HO J et al. N,N'-Carbonyldiimidazole-mediated functionalization of superparamagnetic nanoparticles as vaccine carrier. COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, 20110301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01.03.2011 VOL: 83 No: 1 Págs: 83-90	01.03.2011

	ISSN 0927-7765; figura 1.	
3	<p>D0</p> <p>PHAN N T S et al. Superparamagnetic nanoparticles-supported phosphine-free palladium catalyst for the Sonogashira coupling reaction. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS A: CHEMICAL, 20110104 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</p> <p>04.01.2011 VOL: 334 No: 1-2 Págs: 130-138 ISSN 1381-1169; esquema 1.</p>	04.01.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a nanopartículas de óxido de hierro seleccionado entre magnetita, maghemita, hematita o cualquiera de sus combinaciones, cuya superficie está modificada directamente con grupos hidroxilo, sin espaciadores, y caracterizadas por un potencial zeta mayor de 20mV en suspensión acuosa a un pH de 8 a 6.

El documento D01 divulga nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cuya superficie está modificada por grupos amino e hidroxilo, o por grupos amino, hidroxilo y carboxilo.

El documento D02 divulga la preparación de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) conjugadas con ovoalbúmina mediante una reacción mediada por N,N'-carbonildiimidazol. La figura 1 muestra un esquema del procedimiento de preparación, en el que se representan las nanopartículas con grupos hidroxilo en su superficie. Las nanopartículas obtenidas son útiles como vehículo portador de vacunas.

El documento D03 divulga la preparación de nanopartícula superparamagnéticas de $CoFe_2O_4$ funcionalizadas en su superficie con una base de Schiff, para formar ligandos bidentados inmovilizados. En el esquema 1 se recoge el procedimiento de síntesis de las nanopartículas, en

una de cuyas etapas se representan las nanopartículas que presentan la superficie modificada con grupos hidroxilo.

Ninguno de los documentos citados divulga nanopartículas de óxido de hierro con superficie modificada por grupos hidroxilo, que presenten un potencial zeta mayor de 20mV en suspensión acuosa a un pH de 8 a 6. Según se desprende de la descripción, estos valores de potencial zeta conseguidos tras el tratamiento post-síntesis de las nanopartículas, son indicativos de la adecuada calidad del recubrimiento.

Por ello, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1-14 de la solicitud es nueva e implica actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).