

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



**ESTUDIO DE LA ESTABILIZACIÓN DE NANOPRISMAS  
DE ORO CONJUGADOS CON ANGIOPEP-2 Y SU  
EVALUACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de especialización Toxicología y  
Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de  
Bioquímico por:**

**CAMILO ANDRÉS ORTIZ OJEDA**

Directores de Tesis:

**Dr. Marcelo J. Kogan**

**Dr. Rodrigo Sierpe Bustamante**

Santiago-Chile

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

**CAMILO ANDRÉS ORTIZ OJEDA**

Han sido aprobados por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular, y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

---

**Directores de tesis:**

Dr. Marcelo J. Kogan. \_\_\_\_\_

Dra. Rodrigo Sierpe Bustamante. \_\_\_\_\_

**Comisión evaluadora de Tesis:**

Dr. Mauricio Báez Larach. \_\_\_\_\_

Dra. Lorena García Nannig. \_\_\_\_\_

Dr. Paul Jara Vergara. \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi núcleo familiar, mis padres Blanca, Víctor y mi hermana Katia, que sin su ayuda no podría haber estudiado en la Universidad y que siempre han sido y serán un soporte elemental tanto en mi vida profesional como personal. También agradecer encarecidamente a mis amigos que conocí durante la carrera de Bioquímica, Nicole Huerta, Ariel Araya y Rodrigo Osorio, que sin ellos el terminar la carrera se habría vuelto imposible. De igual manera, les doy las gracias más que merecidas a mis compañeros de laboratorio que me ayudaron ya sea con enseñarme algo que desconocía o con un simple consejo durante el transcurso y desarrollo de la tesis para poder terminarla con éxito.

Agradecimientos al Dr. Marcelo Kogan por haberme permitido ser parte de su laboratorio de trabajo y al Dr. Rodrigo Sierpe por toda la ayuda y soporte brindados durante la realización de este trabajo de tesis. Además, agradecimientos para los proyectos Fondecip EQM170111 y EQM160157 por facilitar el uso y empleo de los equipos Nanosight y Microscopio electrónico de transmisión.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1170929 y FONDAP 15130011 (Dr. Marcelo Kogan).

# TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	i
FINANCIAMIENTO.....	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
<b>Capítulo I: Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Nanopartículas de oro: características y aplicaciones.....	1
1.2. Nanoprismas de oro para terapia y diagnóstico.....	5
1.3. Interacción de nanopartículas con proteínas plasmáticas.....	7
1.3.1. Formación de la corona de proteínas y su efecto sobre las nanopartículas de oro.....	7
1.3.2. Efecto de la corona de proteínas sobre la estabilidad y la toxicidad de las nanopartículas de oro.....	9
1.4. Utilización de polietilenglicol en NPO como agente estabilizante.....	9

1.5. Importancia de las características fisicoquímicas en el comportamiento biológico de las NPO.....	11
1.6. Uso de NPO para terapia contra la enfermedad de Alzheimer.....	13
1.7. Estrategias para aumentar la llegada de las NPO hacia el cerebro.....	15
1.8 Citotoxicidad de las nanopartículas de oro.....	18
PROPUESTA DE TRABAJO.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>Capítulo II: Metodología.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Sintetizar, conjugar y caracterizar los nanoprismas de oro funcionalizados con PEG y ANG2.....</b>	<b>21</b>
1.1. Síntesis de NprO.....	21
1.2. Conjugación de nanoprismas de oro con HS-PEG-Ome y HS-PEG-COOH.....	22
1.3. Enriquecimiento de nanoprismas de oro funcionalizados con PEGs.....	22
1.4. Funcionalización de nanoprismas de oro-PEGs con ANG2.....	23
1.5. Caracterización fisicoquímica de los nanosistemas obtenidos.....	24
1.5.1. Espectroscopía UV-Visible.....	24
1.5.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	24

1.5.3. Potencial Zeta.....	24
1.5.4. Cálculo de la concentración de nanoprismas de oro.....	25
1.5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (SEM).....	26
<b>2. Evaluación de la estabilidad coloidal de nanoprismas de oro en medios de relevancia biológica.....</b>	<b>27</b>
2.1 Estabilidad en medio de cultivo DMEM/F12 1%.....	27
2.2. Estabilidad en Tampón fosfato salino (PBS).....	27
<b>3. Evaluar la citotoxicidad del nanosistema NprO-PEGs-ANG2 en la línea celular SH-SY5Y.....</b>	<b>28</b>
3.1. Ensayo de viabilidad celular MTS.....	28
3.2. Ensayo azul de tripán (TPB).....	28
3.3. Imagenología y fluorescencia por Calceína.....	29
3.4. Citometría de flujo.....	30
<b>Capítulo III: Resultados y discusión.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Sintetizar, conjugar y caracterizar los nanoprismas de oro funcionalizados con PEG y ANG2.....</b>	<b>31</b>
1.1. Síntesis de nanoprismas de oro.....	31
1.2 Conjugación de nanoprismas de oro con HS-PEG-Ome y HS-PEG-COOH.....	36
1.3. Enriquecimiento de nanoprismas de oro con PEGs.....	40

1.4. Funcionalización de nanoprismas de oro-PEGs con ANG2.....	47
1.5. Cálculo de la concentración de nanoprismas de oro.....	52
1.5.1. Determinación mediante absorción atómica.....	52
1.5.2. Determinación mediante análisis de seguimiento de nanopartículas...	53
<b>2. Evaluar la estabilidad coloidal de nanoprismas de oro en medios de relevancia biológica.....</b>	<b>57</b>
2.1. Estabilidad en medio de cultivo DMEM/F12 1%.....	57
2.2. Estabilidad en tampón fosfato salino (PBS).....	61
<b>3. Evaluar la citotoxicidad del nanosistema NprO-PEGs-ANG2 en la línea celular SH-SY5Y.....</b>	<b>65</b>
3.1. Ensayo de viabilidad celular MTS.....	65
3.2. Ensayo azul de tripán (TPB).....	67
3.3. Imagenología y Fluorescencia por Calceína.....	69
3.4. Citometría de flujo.....	71
<b>Capítulo IV: Conclusiones y Proyecciones.....</b>	<b>75</b>
ANEXOS.....	78
BIBLIOGRAFÍA.....	82



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Distintas aplicaciones de las nanopartículas de oro.....	2
Figura 2. Efecto fototérmico en nanopartículas de oro.....	3
Figura 3. dimensiones de un nanoprisma.....	5
Figura 4. Corona de proteínas formada en nanopartículas.....	8
Figura 5. Efecto del recubrimiento de una NPO con PEG en circulación sanguínea.....	10
Figura 6. Efectos en la internalización y toxicidad celular dependiente de la carga superficial de la NPO.....	13
Figura 7. La influencia del efecto fototérmico de nanovarillas de oro la desagregación de $A\beta_{1-40}$ .....	14
Figura 8. Mecanismo de transporte de angiopep-2 mediado por receptor LRP1.....	16
Figura 9. Imagen in vivo de fluorescencia en cerebro de ratón.....	17
Figura 10. Resumen de la propuesta de trabajo.....	19
Figura 11. Cambio de color en la síntesis de NprO.....	31
Figura 12. Espectro de absorción UV-vis de los NprO.....	32
Figura 13. Estabilidad coloidal de los NprO desde su obtención.....	33
Figura 14. Distribución de tamaños por intensidad de los NprO.....	33
Figura 15. Gráfico de las cargas superficiales de los NprO.....	34

Figura 16. Imagen TEM de NprO.....	34
Figura 17. Imagen SEM de NprO.....	35
Figura 18. Espectros de absorción UV-vis de NprO-PEGs.....	36
Figura 19. Estabilidad coloidal de los NprO-PEGs.....	37
Figura 20. Distribución de tamaños de NprO-PEGs.....	38
Figura 21. Gráfico de las cargas superficiales de NprO-PEGs.....	38
Figura 22. Imagen TEM de NprO-PEGs.....	39
Figura 23. Imagen SEM de NprO-PEGs.....	39
Figura 24. Sobrenadantes del enriquecimiento de NprO-PEGs.....	41
Figura 25. Espectros U.V-vis normalizado de las distintas fracciones de la separación de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	42
Figura 26. Estabilidad coloidal de los NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	43
Figura 27. Distribución de tamaños de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	44
Figura 28. Gráfico de potenciales zeta de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	44
Figura 29. Imagen TEM de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	45
Figura 30. Imagen SEM de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	45
Figura 31. Espectros de absorción UV-vis de NpO-PEGs-ANG2.....	48
Figura 32. Estabilidad coloidal de NprO-PEGs-ANG2.....	48
Figura 33. Distribución de tamaños de NprO-PEGs-ANG2.....	49

Figura 34. Gráfico de potenciales zeta de NprO-PEGs.....	49
Figura 35. Imagen TEM de NprO-PEGs-ANG2.....	50
Figura 36. Imagen SEM de NprO-PEGs-ANG2.....	50
Figura 37. Resumen espectros UV-visible.....	51
Figura 38. Gráfico NTA de NprO-PEGs.....	54
Figura 39. Gráfico NTA de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	55
Figura 40. Gráfico de concentración de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> .....	55
Figura 41. Espectro UV-vis de NprO en DMEM/F12 1%.....	58
Figura 42. Espectro UV-vis de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> en DMEM/F12 1%.....	58
Figura 43. Espectro UV-vis de NprO-PEGs-ANG2 en DMEM/F12 1%.....	59
Figura 44. Gráfico del diámetro hidrodinámico en DMEM/F12 1%.....	60
Figura 45. Gráfico de la carga superficial en DMEM/F12 1%.....	60
Figura 46. Espectro UV-vis de NprO en PBS.....	62
Figura 47. Espectro UV-vis de 0 en PBS.....	62
Figura 48. Espectro UV-vis de NprO-PEGs-ANG2 en PBS.....	63
Figura 49. Gráfico del diámetro hidrodinámico en PBS.....	64
Figura 50. Gráfico de la carga superficial en PBS.....	64
Figura 51. Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS.....	66
Figura 52. Tinción por azul de tripán en SH-SY5Y.....	67

Figura 53. Gráfico viabilidad celular por azul de tripán.....	68
Figura 54. Imágenes por Microscopía con fluorescencia para C+ y C-.....	69
Figura 55. Imágenes por microscopía con fluorescencia verde para NprO, NprO-PEGs <sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2.....	70
Figura 56. Gráfico viabilidad celular por intensidad de fluorescencia.....	70
Figura 57. Gráficos de las poblaciones en los controles C+ y C-.....	72
Figura 58. Gráficos de las poblaciones en los tratamientos.....	73
Figura 59. Gráfico de viabilidad celular por citometría de flujo.....	74
Figura 1s. Gráfica de la curva de calibración de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> por absorción atómica.....	78
Figura 2s. Gráfica de la curva de calibración de NprO-PEGs <sup>ENR</sup> por NTA.....	79
Figura 3s. Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS a 48 hrs.....	80
Figura 4s. Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS a 48 hrs.....	80
Figura 5s. Gráfico viabilidad celular por azul de tripán a 72 hrs.....	81
Figura 6s. Gráfico viabilidad celular por azul de tripán a 72 hrs.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de la razón prismas/esferas.....	43
Tabla 2. Resumen datos UV-vis, DLS, potencial zeta y TEM.....	52
Tabla 1s. Datos curva de calibración por absorción atómica.....	78
Tabla 2s. Datos curva de calibración por NTA.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -amiloide
<b>ANG2</b>	Péptido Angiopep-2
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>CALC</b>	Calceína
<b>CALC-AM</b>	Calceína con grupo ester
<b>CP</b>	Corona de proteínas
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<b>HdE</b>	Homodímero de Etidio
<b>HS-PEG-COOH</b>	Polietilenglicol tiolado con carboxilo terminal

<b>HS-PEG-OMe</b>	Polietilenglicol tiolado con metoxilo terminal
<b>FACS FLOW</b>	Medio para la clasificación celular por fluorescencia activada
<b>MTS</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>NIR</b>	Región del Infrarrojo Cercano
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>NeO</b>	Nanoesferas de oro
<b>NPO</b>	Nanopartícula de oro
<b>NprO</b>	Nanoprismas de oro
<b>NvO</b>	Nanovarillas de oro
<b>NprO-PEG-COOH</b>	Nanoprisma de oro conjugado con HS-PEG-COOH
<b>NprO-PEG-OMe</b>	Nanoprisma de oro conjugado con HS-PEG-OMe
<b>NprO-PEGs</b>	Nanoprisma de oro conjugado con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH
<b>NprO-PEGs<sup>ENR</sup></b>	Nanoprisma de oro conjugado con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH enriquecidos

<b>NprO-PEGs-ANG2</b>	Nanoprisma de oro conjugado con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH enriquecidos y funcionalizados con angiopep-2
<b>NAT</b>	Análisis de seguimiento de nanopartículas
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PMS</b>	Metosulfato de fenazina
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>RPS</b>	Resonancia de plasmón
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TPB</b>	Azul de tripán
<b>Trip1X</b>	Tripsina 1X

## RESUMEN

Las nanopartículas de oro han ganado un gran interés científico ya que presentan propiedades y características únicas como una gran área superficial, resonancia de plasmón superficial, son biocompatibles y fáciles de sintetizar, entre otras. Pueden ser irradiadas de manera externa, absorbiendo energía, y liberarla de manera localizada en forma de calor, proceso denominado fototermia, el cual se ha utilizado en estrategias para destruir células cancerígenas o para desagregar agregados tóxicos, como los presentes en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Para esta aplicación, las nanopartículas deben ser irradiadas con longitudes de onda en la región del infrarrojo cercano, denominada “ventana biológica” (700 a 1100 nm de longitud de onda) donde los tejidos no absorben la irradiación.

Los nanoprismas de oro utilizados en esta tesis son estructuras anisotrópicas que poseen absorción en la “ventana biológica”, por lo que actualmente se investigan para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Son sintetizados de manera sencilla y sin la utilización de reactivos tóxicos. Se sintetizaron y caracterizaron nanoprismas de oro, los cuales fueron multifuncionalizados con polietilenglicol, otorgando estabilidad al nanosistema, y con el péptido angiopep-2, que se ha reportado que permite el traspaso de las nanopartículas de oro a través de la barrera hematoencefálica mediante un mecanismo de transcitosis mediada por el receptor de lipoproteínas de baja densidad LRP1.

La conjugación se realizó con dos tipos de polietilenglicol; el HS-PEG-Ome, que disminuye las interacciones inespecíficas y el HS-PEG-COOH, que posee un grupo carboxílico para la formación de un enlace amida con el péptido. Mediante la caracterización del nanosistema en las distintas etapas de



conjugación y funcionalización se corroboró la incorporación de polietilenglicol y angiopep-2 a los nanoprismas de oro. Además, el nanosistema fue enriquecido mediante el uso de un protocolo de centrifugaciones. Por otra parte, se evaluó la estabilidad coloidal en medio de cultivo DMEM/F12 1% y PBS, siendo los nanoprismas de oro estables en sus distintos grados de multifuncionalización, con excepción de los nanoprismas desnudos en PBS los que son completamente inestables.

Finalmente, estos nanosistemas obtenidos no presentaron efectos sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y a las condiciones estudiadas, haciendo a estos nanoprismas de oro un buen candidato para su utilización en terapia para enfermedades como la enfermedad de Alzheimer.

## **SUMMARY**

Gold nanoparticles have gained great interest in science because they have unique properties and characteristics such as a large surface area, surface plasmon resonance, are biocompatible and easy to synthesize, among others. They can be irradiated externally, absorbing energy, and releasing in the form of heat it in a localized manner, process called photothermia, which has been used in strategies to destroy cancer cells or to disintegrate toxic aggregates, such as those present in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. For this application, the nanoparticles must be irradiated with wavelengths in the near infrared region, called "biological window" (700 to 1100 nm wavelength) where the tissues do not absorb the irradiation.

The gold nanoprisms used in this thesis are anisotropic structures that have absorption in the "biological window", so they are currently being investigated for the diagnosis and treatment of diseases. They are synthesized in a simple way and without the use of any toxic reagents. Gold nanoprisms were synthesized and characterized, which were multifunctionalized with polyethylene glycol, granting stability to the nanosystem, and with the angiopep-2 peptide, which has been reported to allow the transfer of gold nanoparticles through the blood-brain barrier by a mechanism of transcytosis mediated by the low-density lipoprotein receptor LRP1.

The conjugation with two types of polyethylene glycol was carried out; HS-PEG-Ome, which decreases the nonspecific interactions and HS-PEG-COOH, which possesses a carboxylic group for the formation of amide bond with the peptide. By characterizing the nanosystem in the different stages of conjugation and functionalization, the incorporation of polyethylene glycol and angiopep-2 to gold nanoprisms was corroborated. In addition, the nanosystem using a centrifugation protocol was enriched. On the other hand, the colloidal stability in DMEM/F12 1% culture medium and PBS was evaluated, being the gold nanoprisms stable in their different degrees of multifunctionalization, with exception of naked nanoprisms in PBS, which are completely unstable.

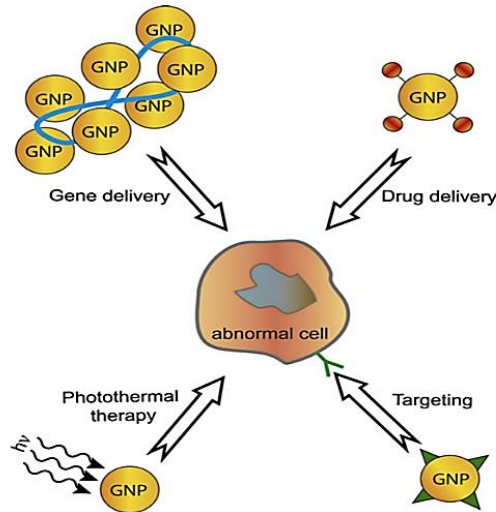
Finally, these obtained nanosystems showed no effects on the cellular viability of the SH-SY5Y line under the conditions studied, making these gold nanoprisms a good candidate for their use in therapy for diseases such as Alzheimer's disease.

# Capítulo I

## Introducción

### 1. Nanopartículas de oro: características, propiedades y aplicaciones.

En la actualidad el avance de la nanotecnología ha llevado al desarrollo y uso de una gran cantidad de nanomateriales con aplicaciones directas en áreas farmacéuticas y médicas, entre otras [1]. En el diseño de una terapia efectiva, es necesario que el fármaco llegue a su sitio de acción. Para lograr este propósito pueden emplearse nanopartículas que actúen como vehículos para la entrega de fármacos, ya que estas poseen un tamaño en la misma escala de las estructuras biológicas, permitiendo una interacción efectiva con los sitios de interés. Por ejemplo, puede mencionarse el uso de nanopartículas formadas por polímeros, dendrímeros, metales o lípidos (liposomas) [2]. Entre las nanopartículas metálicas, las nanopartículas de oro (NPO) son de gran interés y han sido ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas, tales como imagenología [3, 4], biosensores [5, 6], entrega de material genético [7, 8] y moléculas de interés biológico [9] (Figura 1).

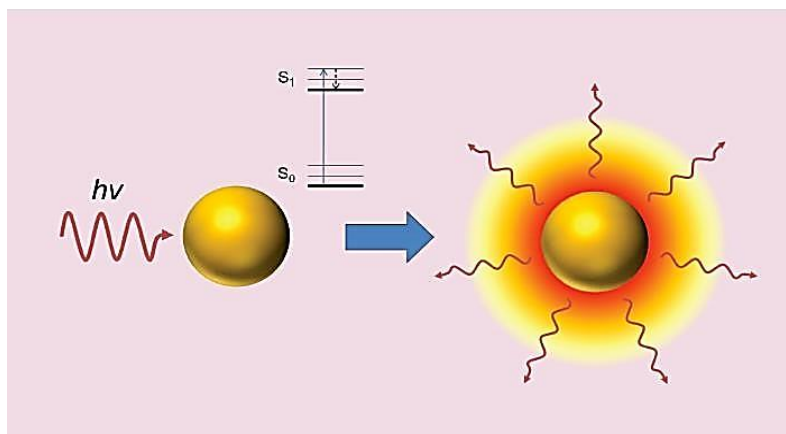


**Figura 1.** Esquema que representa las distintas aplicaciones de las nanopartículas de oro. Para la entrega de material genético, fármacos, terapia fototérmica y direccionamiento hacia una célula anormal o cancerígena. Extraído de la referencia 2.

Estas NPO poseen propiedades físicas y químicas únicas [10] e intrínsecas a su tamaño nanométrico, cuentan con una gran área superficial, aumentando su reactividad y facilitando la interacción con distintos agentes terapéuticos, tales como fármacos o péptidos, incrementando su solubilidad, estabilidad, modificando los parámetros farmacocinéticos y posibilitando el direccionamiento hacia un blanco específico [2]. Adicionalmente, las NPO son capaces de atravesar membranas biológicas y penetrar células por distintos mecanismos, lo que permite ejercer su acción al interior de estas [7, 8], pudiendo también promover la entrega del material anexado a su superficie [2, 7, 10].

En estudios sobre cáncer se ha observado que las NPO se acumulan preferentemente en los tejidos tumorales en relación con los tejidos sanos, lo cual es debido al denominado efecto de permeación y retención aumentada, que se da en tumores producto de irregularidades en el endotelio vascular [11].

También poseen propiedades ópticas dadas por la interacción de la radiación electromagnética con los electrones confinados en la superficie del nanomaterial, produciendo una resonancia de plasmón superficial localizada (RPS). Donde el campo eléctrico de la luz incidente a una NPO induce un dipolo eléctrico en la partícula, desplazando parte de los electrones deslocalizados, generando una carga neta negativa. Como el resto de los electrones internos no se han desplazado, constituyen una carga opuesta positiva. Esta separación de cargas actúa como una fuerza restauradora del equilibrio, donde los electrones movidos por el campo eléctrico vuelven a su estado basal emitiendo energía en el proceso, donde parte de esa energía se transforma en calor local, fenómeno que se conoce como efecto fototérmico [12] (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto fototérmico en nanopartículas de oro. Al hacer incidir irradiaciones en el rango visible o cercano al infrarrojo, las nanopartículas de oro absorben luz ( $h\nu$ : fotón de luz). Esta absorción de energía lleva a una transición electrónica de los electrones de la superficie de un estado basal ( $S_0$ ) a un estado excitado ( $S_1$ ). Parte de la energía es disipada a los alrededores de la nanoestructura como calor local en todas las direcciones. Extraído de la referencia 14.

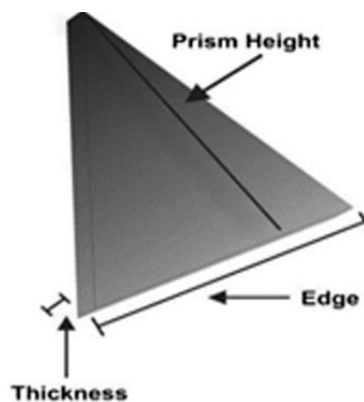
La disipación local de calor puede ser utilizada para la destrucción de células tumorales o de agregados tóxicos de proteínas  $\beta$ -amiloide involucrados en la

enfermedad de Alzheimer. Esto último es muy relevante para el desarrollo de sistemas con fines terapéuticos en cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, las NPO al interactuar con la radiación producen dispersión de esta, siendo empleadas para la detección de células tumorales, logrando aumentar la resolución de imágenes y mejorar así el diagnóstico [13]. Para producir una oscilación colectiva de electrones, la irradiación incidente de las NPO debe ser de una longitud de onda significativamente mayor a su tamaño [13, 14]. La frecuencia de resonancia de esta oscilación colectiva se encuentra en el rango visible e infrarrojo cercano del espectro electromagnético y puede ser seguido por espectroscopia UV-Visible [15]. Las NPO tienen la posibilidad de acoplar la terapia fototérmica y actuar como agentes de imagen/contraste. Esta dualidad de función puede ser empleada para la denominada teragnosis, en la que un mismo nanomaterial puede emplearse para el diagnóstico y la terapia de una enfermedad [16].

Las NPO se han utilizado como sondas de imagen óptica para cáncer [17, 18] y como agentes de contraste de rayos X debido a que exhiben una alta atenuación de estos rayos, permitiendo obtener imágenes moleculares mediante tomografía computarizada [19]. Un ejemplo del uso en detección *in vitro* es con espectroscopía Raman, la que con el uso de NPO puede emplearse para la detección por un método denominado espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS, de sus siglas en inglés). La técnica consiste en amplificar la dispersión de la luz incidente debido a la presencia de NPO o nanopartículas de plata ubicadas cerca del analito de interés [20, 21]. Así, la técnica SERS ofrece una mayor sensibilidad, permitiendo la detección de moléculas aisladas, aplicable por ejemplo al diagnóstico enfermedades como Alzheimer, permitiendo así detectar etapas tempranas del desarrollo de ésta [22].

## 1.2. Nanoprismas de oro para terapia y diagnóstico.

Factores como el tamaño, la carga y la forma de las NPO son relevantes para potenciales usos en terapia y diagnóstico [23]. Para una terapia fototérmica adecuada, es necesario que las NPO posean una RPS con una banda de absorción intensa dentro de la ventana biológica de la NIR [24]. Los nanoprismas de oro (NprO) son estructuras anisotrópicas (Figura 3) [25], actualmente en estudio como una novedosa forma de NPO, ya que pueden ser obtenidas en diferentes tamaños, con protocolos de síntesis sencillos, rápidos, y con un posicionamiento de la banda de plasmón en la región infrarroja (NIR) [26]. Estos NprO son fácilmente funcionalizables con una diversidad de ligandos, lo que conlleva a ampliar las aplicaciones que poseen este tipo de partículas en los campos de la nanomedicina [27].



**Figura 3.** Dimensiones de un nanoprisma. Extraído de la referencia 27

Los NprO exhiben características morfológicas y ópticas interesantes, además de facetas cristalográficas bien definidas [28, 29], y así el interés por su aplicación se acrecienta en estos años. Se han reportado estudios con el uso de NprO para la detección mejorada de analitos [30, 31] y su efecto fototérmico

para la destrucción de células tumorales *in vitro* [32, 33]. En cuanto a detección y diagnóstico, los NprO pueden ser usados en técnicas de imagenología como de análisis *in vitro* mediante SERS. Sin embargo, las investigaciones sobre aplicaciones de NprO en Alzheimer son escasas. Es por estos motivos que se hace necesario realizar estudios que permitan evaluar los posibles efectos citotóxicos de este tipo de NPO si se pretende utilizar con este fin. Cabe destacar que los NprO a diferencia de otras NPO anisotrópicas pueden ser sintetizadas usando solo 2 reactivos, sin la presencia de agentes tóxicos tal como el ampliamente usado bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El tiosulfato de sodio que actúa como agente reductor, es además un antídoto ocupado frente a la intoxicación por cianuro [34] representando una gran ventaja de cara a sus potenciales aplicaciones biológicas.

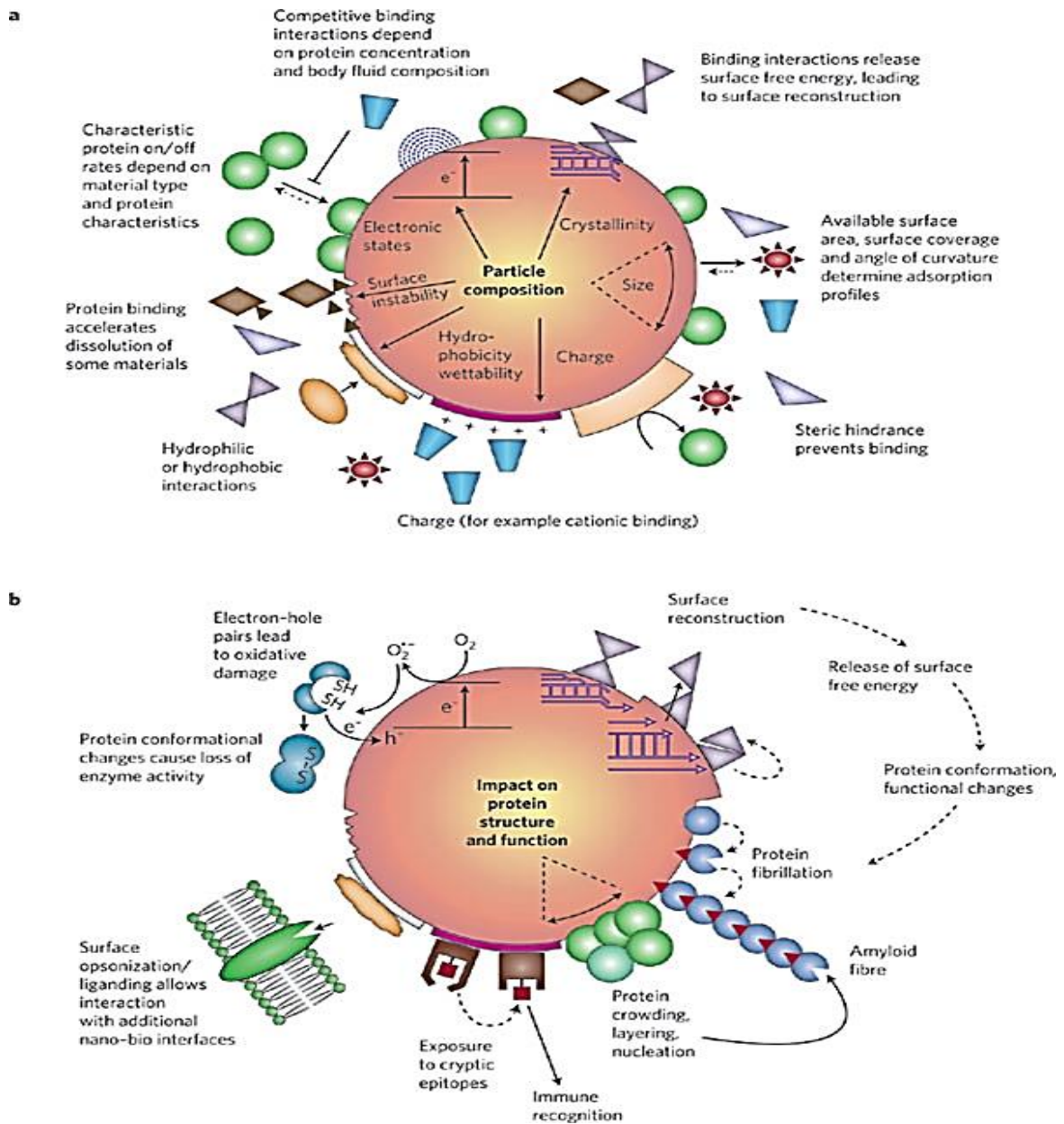
Para este proyecto se utilizó un protocolo de síntesis modificado por Pelaz y cols., que ha demostrado generar un alto rendimiento de formación de prismas con respecto a esferas o disco, los cuales son subproductos clásicos de este tipo de síntesis [35]. Además, un importante atributo que tienen estos NprO es que pueden ser utilizados para teragnosis, ya que se han utilizado ampliamente en la creación de imágenes biológicas debido a su capacidad de ajustar la resonancia de plasmón máxima aún más en la región NIR [35, 36]. Bao y cols. reportaron el uso de NprO como un nuevo agente de contraste para la técnica híbrida de formación de imágenes fotoacústicas, proponiendo una promisoría aplicación de estos nanomateriales para imagenología y fototerapia [37].



### **1.3. Interacción de nanopartículas con proteínas plasmáticas**

#### **1.3.1 Formación de la corona de proteínas y su efecto sobre las nanopartículas de oro**

Otro de los factores que tienen influencia sobre los efectos de las NPO, es la interacción con biomoléculas, prioritariamente proteínas, de diferentes fluidos biológicos, las cuales recubren a las NPO y forman la corona de proteínas (CP) (Figura 4), la cual se origina una vez que la partícula interactúa con el plasma u otro ambiente biológico. Este recubrimiento de la superficie de las nanopartículas produce efectos con la interacción de proteínas y modula la biodisponibilidad y el reconocimiento del blanco terapéutico [38, 39, 92]. Actualmente existen estrategias para el recubrimiento de las NPO y así poder disminuir las interacciones con la CP [40].



**Figura 4.** Corona de proteínas formada en nanopartículas **a)** las características materiales preexistentes que contribuyen a la formación de la corona en un entorno biológico. Las tasas de adhesión/desprendimiento de proteínas características, las interacciones competitivas de unión, el impedimento estérico por detergentes y polímeros adsorbidos y el perfil de proteína del fluido corporal conducen a cambios dinámicos en la corona. La corona puede cambiar cuando las partículas se desplazan de un compartimento biológico a otro, **b)** Los cambios potenciales en la estructura y función de una proteína como resultado de la interacción con la superficie de la nanopartícula pueden conducir a mecanismos moleculares que den lugar a efectos tóxicos. Los símbolos de colores representan varios tipos de proteínas, que incluyen proteínas cargadas, lipofílicas, conformacionalmente flexibles, enzimas catalíticas con grupos tioles sensibles y proteínas que se aglomeran o interactúan para formar fibrillas. Extraído de referencia 92.

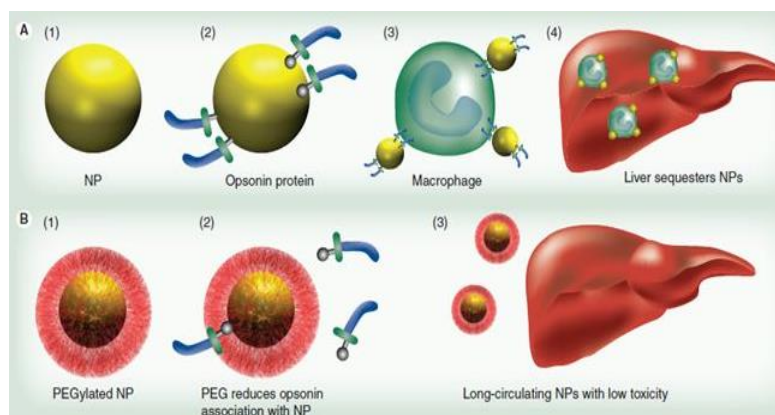
### **1.3.2. Efecto de la corona de proteínas sobre la estabilidad y la toxicidad de las nanopartículas de oro**

La interacción de las NPO con las proteínas del plasma puede producir plegamientos anómalos y agregación de proteínas pudiendo producir efectos tanto nocivos como beneficiosos para la salud [41]. Algunas proteínas pueden verse afectadas provocando su plegamiento y pérdida de su función [42]. Además, existen interacciones con amino tioles como el glutatión, en donde se ha determinado que el tiempo de recambio de tioles en superficie de la NPO es mayor a medida que estas son de mayor tamaño, por lo cual esto podría inducir ciertos fenómenos no deseados, como disminuir la cantidad de GSH presente en el plasma, afectando procesos biológicos [43]. Por tanto, es necesario modificar la superficie de las NPO para evitar estas desventajas para potenciales bioaplicaciones.

### **1.4. Utilización de polietilenglicol en NPO como agente estabilizante**

La estabilidad de las NPO en un determinado medio biológico, junto con el tiempo de circulación *in vivo* son factores que considerar para sus aplicaciones terapéuticas. Dicha estabilidad puede ser incrementada por la utilización de distintos agentes como ácido mercaptosuccínico, ácido mercaptopropiónico, material genético o polietilenglicol (PEG) [44], entre varios otros. Mientras menor es el tamaño de la nanopartícula, con una superficie, neutra e hidrofílica, mayor es la vida media en el plasma [45]. Diversos estudios han evidenciado que la formación de la corona de proteínas cubre las nanopartículas con distintos polímeros hidrofílicos, formando una capa que además de proveer una

estabilización estérica, reduce la opsonización (Figura 5) [46, 47]. El PEG modificado con un grupo tiol (-SH), es uno de los ligandos de superficie más utilizados para incrementar la vida media en circulación de las nanopartículas bloqueando la adsorción de proteínas séricas [48]. El grupo terminal -SH que posee le permite la quimisorción a la superficie de las NPO dando origen a un enlace azufre-oro estable [49-53]. Adicionalmente, las moléculas de PEG unidas actúan como espaciadores de otras moléculas activas, permitiendo un mejor reconocimiento molecular del blanco [54]. El recubrimiento con PEG también disminuye la carga superficial de las NPO acercándolas a la neutralidad y disminuyendo así las interacciones inespecíficas por cargas [55].



**Figura 5.** Efecto del recubrimiento de las NPO con PEG en circulación sanguínea. (1) Una NPO sin recubrimiento será recubierta por opsoninas como respuesta del sistema inmune para su captura por los macrófagos y posterior secuestro al hígado. (2) NPO recubierta con PEG en su superficie, disminuirá estas interacciones con opsoninas, prologando el tiempo en circulación con baja toxicidad, aumentando así su disponibilidad para interactuar con su blanco. Extraído de la referencia 46.

A modo de ejemplo, Niidome y cols. inyectaron por vía intravenosa NvO recubiertas con PEG, observando que estas permanecen en circulación por un período de tiempo mayor que NvO sin modificar, lo que disminuye su acumulación en el hígado [56]. Por otro parte, se ha observado también que en

liposomas recubiertos con PEG, el tiempo de circulación es aproximadamente seis veces mayor que para liposomas sin este recubrimiento, mientras que la cantidad que fue captada por el sistema reticuloendotelial fue tres veces menor [55].

*En este trabajo, los NprO fueron conjugados con PEG con el fin de reducir interacciones no específicas y aumentar la estabilidad de estos nanosistemas en medios biológicos como el medio de cultivo DMEM/F12 1% y el tampón PBS. Además, se espera que por la reducción de la carga superficial exista una reducción en la citotoxicidad.*

### **1.5. Importancia de las características fisicoquímicas en el comportamiento biológico de las NPO**

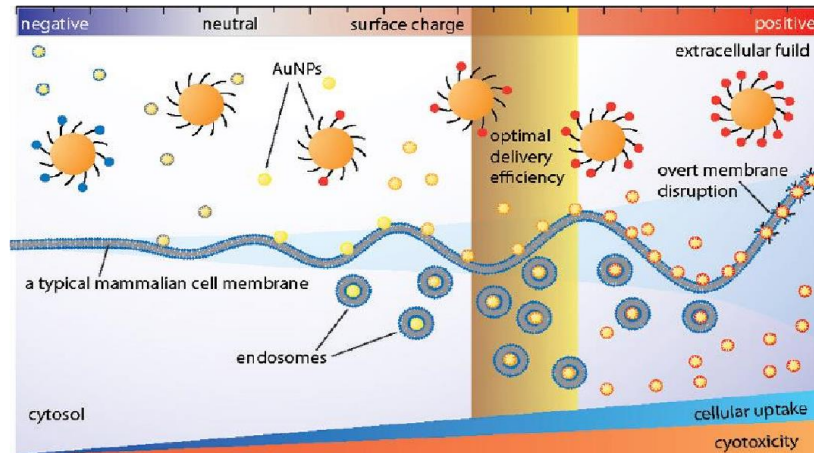
Para aplicaciones farmacéuticas de las NPO es importante considerar los distintos factores que pueden generar interacciones específicas e inespecíficas en el organismo, modificando penetración, biodisponibilidad y/o toxicidad de estos nanosistemas, entre otras. La estabilidad de las NPO juega un rol fundamental, la cual es dependiente del tamaño, forma, carga superficial y su recubrimiento. Respecto al tamaño de las NPO, este juega un rol importante en el proceso de internalización celular [57, 58]. Nanoesferas de oro (NeO) de 5 nm son internalizadas por difusión pasiva, pudiendo difundir a través de poros transitorios sin disrupción de la membrana celular. A mayores tamaños, de 20 a 50 nm, son internalizadas por endocitosis, mientras que tamaños mayores a 70 nm no son internalizadas eficientemente [58]. Para estructuras anisotrópicas, Xie y cols. demostraron que las formas de estrellas, triángulos y varillas presentan internalización celular en el rango de 50 a 100 nm, siendo la forma

de triángulo la más eficiente [59]. Sin embargo, es importante mencionar que la razón y alcance de internalización de la NPO puede variar entre las distintas líneas celulares [60]. Asimismo, factores fisicoquímicos como hidrofobicidad llevan a que éstas sean retenidas por elementos celulares del sistema retículo endotelial como macrófagos, siendo posteriormente acumuladas en hígado y bazo, disminuyendo así su llegada al sistema nervioso central. De esta manera, las NPO de tamaños mayores a los 15 nm son excretadas principalmente por la vía biliar [61].

Estudios diversos han demostrado que la captura celular de las NPO se ve significativamente afectada por la carga superficial [62-64]. Un estudio de Cho y cols. demuestra que la internalización de NeO por células SK-BR-3 es dependiente de su densidad de carga superficial, donde las NeO cargadas positivamente exhiben una mayor internalización comparadas con las neutras o cargadas negativamente [65]. Así, la eficacia en la internalización de NeO cargadas positivamente es mayor que para las cargadas negativamente o neutras. La carga negativa de las NPO es directamente proporcional al grado de captación por el sistema fagocítico mononuclear, siendo recubiertas por inmunoglobulinas, proteínas del complemento o fibrinógeno [66]. Mientras que las cargadas positivamente se adhieren a la membrana celular cargada negativamente, facilitando su captura. Además, son capaces de ingresar a las células mediante la generación de poros transitorios de la membrana celular, proceso que podría asociarse con citotoxicidad, ya que también se ha visto que pueden inducir procesos de hemólisis y agregación plaquetaria [63].

La densidad superficial de carga de las NPO proporciona un balance entre la internalización celular y la citotoxicidad para alcanzar una eficiencia de entrega

óptima (Figura 6). Es por esto mismo que resulta imprescindible determinar la carga superficial de las NPO que se desean utilizar con fines terapéuticos.



**Figura 6.** Efectos en la internalización y toxicidad celular dependiente de la carga superficial de la NPO. Las NPO catiónicas interactúan con la membrana, mientras que las aniónicas e hidrofóbicas no pueden alcanzar la membrana de manera fácil. Al incrementar la carga superficial de la NPO, se promueve la internalización, pero también la citotoxicidad. Extraído de la referencia 64.

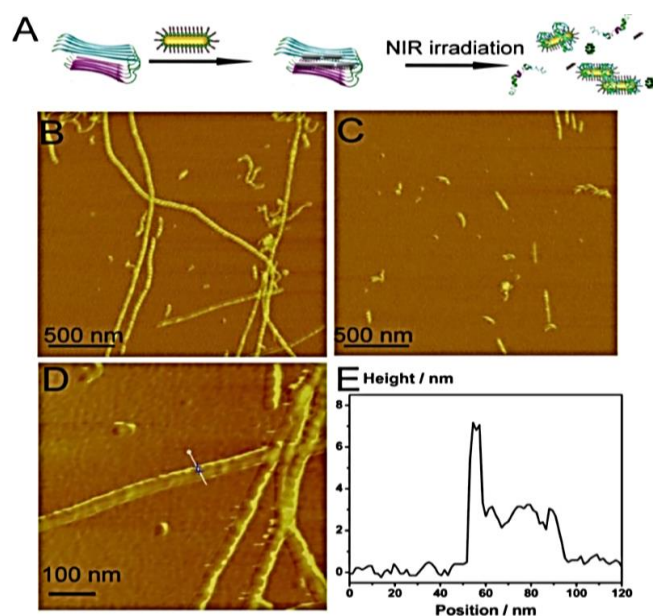
En el caso de que el blanco terapéutico sean los agregados tóxicos de  $A\beta$ , que se encuentran en el cerebro, las NPO deben atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y además evitar unirse a moléculas biológicas que favorezcan su captura por otros órganos como el hígado. Se ha reportado que la unión de proteínas plasmáticas tiene un efecto en la biodistribución [66].

### 1.6. Uso de NPO para terapia contra la enfermedad de Alzheimer

El plegamiento incorrecto, la agregación y la acumulación de proteínas en el cerebro son los mecanismos celulares y moleculares comunes de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson, entre otras [67, 68].

La EA es la forma más común de trastorno neurodegenerativo, representando el 65% de todas las demencias. [69-71]. Un conjunto de evidencias demuestra que la acumulación de proteínas tau y el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) es una de las principales características de la EA [72]. Dado el papel central de la fibrilación de este péptido en la patología, la detección sensible de agregados de  $A\beta$ , la inhibición de su agregación y la desestabilización de las fibrillas de  $A\beta$  son de importancia diagnóstica e implicaciones terapéuticas para el tratamiento de EA.

En un trabajo de Meng y cols. [73], demostraron que mediante el uso del efecto fototérmico de nanovarillas de oro (NvO) funcionalizadas con inhibidores de la agregación de  $A\beta$ ,  $A\beta_{15-20}$  y polioxometalatos, se pueden disociar agregados de  $A\beta_{1-40}$  (Figura 7).



**Figura 7.** La influencia del efecto fototérmico de nanovarillas de oro (NvO) sobre la desagregación de  $A\beta_{1-40}$ . (A) Representación esquemática de NvO utilizadas para disociar la agregación de  $A\beta_{1-40}$ . (B) La morfología de las fibrillas  $A\beta_{1-40}$  en presencia de NvO. (C) La morfología de las fibrillas  $A\beta_{1-40}$  en presencia de NvO posterior a irradiación con láser. (D) Imagen AFM ampliificada localmente de la figura 4B. (E) La altura de NvO en conjunto con fibrillas  $A\beta_{1-40}$ . La concentración de  $A\beta_{1-40}$  y NvO fue de  $50 \mu\text{M}$  y  $0,3 \text{ nM}$ , respectivamente. Extraído de la referencia 73.



Entonces, mediante la inclusión de moléculas que incrementen la estabilidad de las NPO, favorezcan su traspaso a través de la BHE y otorguen direccionamiento hacia un blanco terapéutico como los agregados A $\beta$ , se puede utilizar la liberación local de calor producida por NPO luego de irradiar con láseres para terapias en enfermedades como el Alzheimer [74, 75].

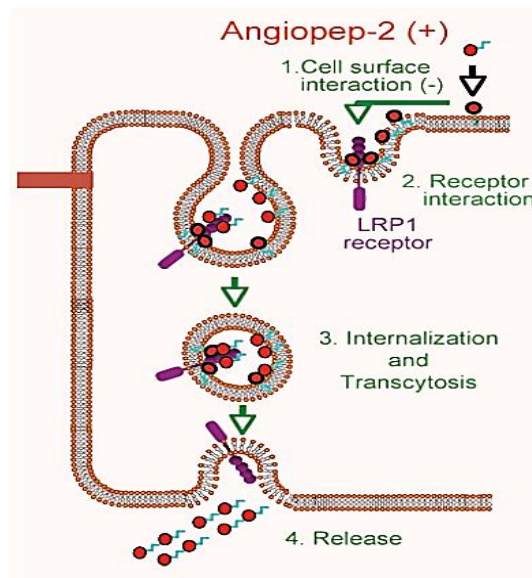
### **1.7. Estrategias para aumentar la llegada de las NPO hacia el cerebro**

El mayor desafío que presentan los agentes farmacéuticos utilizados para el tratamiento de la EA es su bajo porcentaje de ingreso al cerebro debido a la presencia de la BHE la cual es altamente selectiva [76]. Formada principalmente por células endoteliales que recubren los microvasos cerebrales y otros tipos celulares que rodean el endotelio, como los astrocitos y peritrocitos [77]. La relativa impermeabilidad de la BHE es debido a la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales capilares, las cuales están formadas por moléculas de adhesión celular.

El ingreso de principios activos administrados por vía intravenosa podría seguir los siguientes mecanismos: difusión pasiva, transporte paracelular, transcitosis mediada por transportadores, transcitosis adsorptiva y transcitosis mediada por receptores [78-83]. Las estrategias para la entrega de fármacos al sistema nervioso central se basan en la modificación química de las NPO, aprovechando sistemas de transporte y a través de la conjugación con ligandos que reconozcan receptores expresados en la BHE [84].

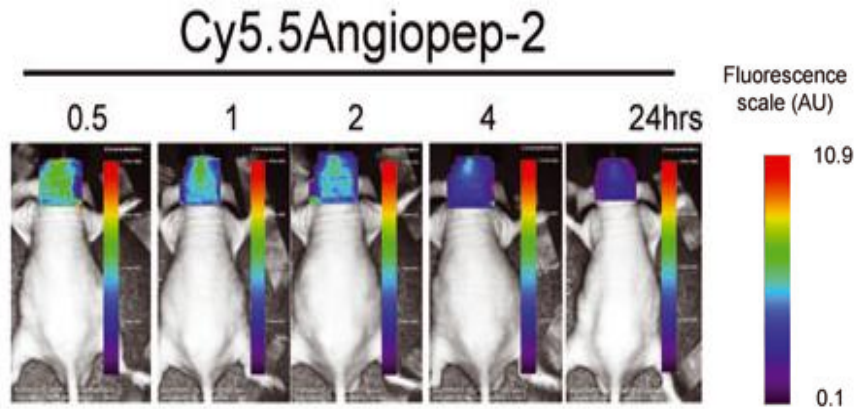
Con el fin de mejorar la entrega al cerebro, se propone el uso de un péptido el cual fue diseñado y demostrado que utiliza la vía mediada por receptor. Este péptido recibe el nombre de angiopep-2 (ANG2) [85], posee una secuencia de

19 residuos (NH<sub>2</sub>-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-COOH) y es ligando para el receptor de lipoproteínas de baja densidad relacionado a proteína-1 (LRP1) [86], el cual es altamente expresado en células endoteliales cerebrales, células tumorales de cerebro, neuronas y astrocitos [87-90]. La representación del transporte realizado por el péptido ANG2 a través de LRP1 (figura 8).



**Figura 8.** Mecanismo de transporte de ANG2 mediado por receptor LRP1. Se observa desde arriba la interacción de ANG2 con la superficie celular, luego la interacción con el receptor, la internalización, la transcitosis y la liberación el péptido desde la célula endotelial de la BHE. Extraído de la referencia 87.

Se demostró además en un estudio *in vivo* en ratones que este péptido es capaz de llegar al cerebro [86]. Mediante la unión covalente de ANG2 con el fluoróforo NIR Cy5.5 (1 kD), el cual por sí solo no es capaz de atravesar la BHE. Se administró el conjugado ANG2-Cy5.5 por inyección intravenosa en la cola de los ratones y se midió la intensidad de fluorescencia en sus cerebros en un rango de tiempo de 30 minutos hasta 24 horas (figura 9).



**Figura 9.** Imagen *in vivo* de fluorescencia en cerebro de ratón. Inyección única intravenosa de ANG2 marcado con la sonda IR Cy5.5 y vista en el tiempo hasta 24 horas. Extraído de la referencia 87.

*En base a los antecedentes planteados, en este proyecto se utilizó el péptido angiopep-2 como un agente de funcionalización de los NprO y se evaluaron sus efectos sobre la viabilidad celular.*

### **1.8. Citotoxicidad de las nanopartículas de oro**

Además del punto de vista fisicoquímico, para cualquier terapia que se desee aplicar, se deben tener en cuenta los potenciales efectos tóxicos que podrían presentar las NPO, los cuales están muy relacionados con sus características tales como carga, tamaño, recubrimiento de la superficie, entre otros [57-91].

Los mecanismos mediante los cuales las nanopartículas podrían ejercer actividad citotóxica pueden ser químicos o físicos [92]. Los mecanismos químicos incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [93], disolución y liberación de iones tóxicos [94], alteración de la actividad de transporte de la membrana de electrones/células de membrana [95], daño oxidativo por catálisis [96], peroxidación lipídica [97] o propiedades

surfactantes [98]. Se considera que ROS es el principal proceso químico subyacente en nanotoxicología, lo que lleva a procesos secundarios que pueden causar daño celular e incluso muerte celular [99]. Los mecanismos físicos son principalmente el tamaño de partícula y las propiedades de superficie [100]. Esto incluye la interrupción de: membranas [101, 102], actividad de membrana [103], procesos de transporte [104], conformación/plegamiento de proteínas [105, 106] y agregación/fibrilación de proteínas [107].

El efecto de nanoesferas sobre la toxicidad ha sido profundamente investigado por varios autores [43, 45, 79]. NeO de tamaños menores a 10 nm mostraron ser tóxicas en estudios celulares *in vitro*. En el caso de NeO de mayor tamaño, 18 y 50 nm no presentaron efectos citotóxicos en las líneas celulares estudiadas [21, 22].

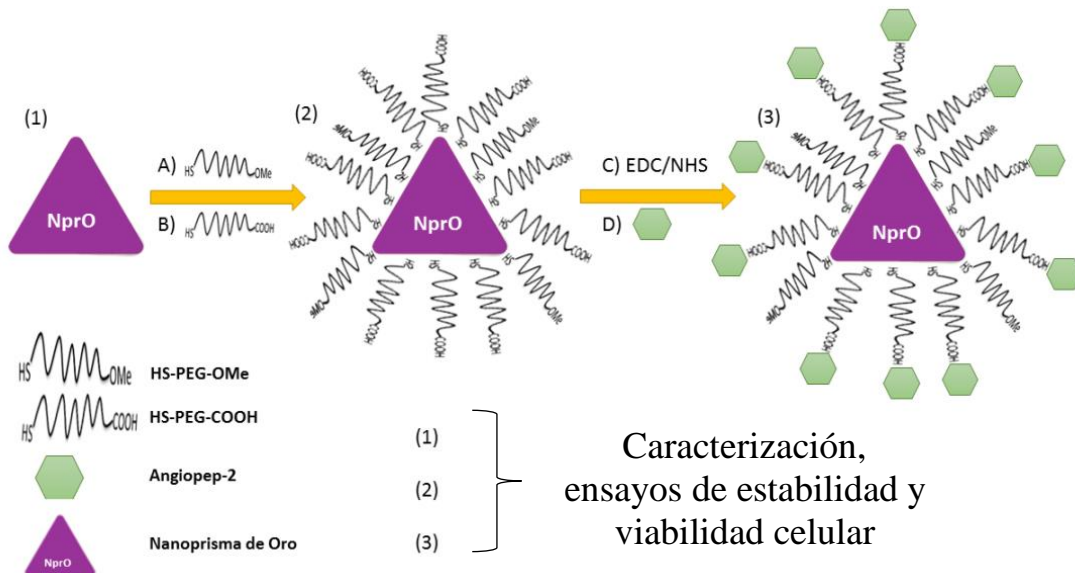
Las estructuras anisotrópicas como las nanovarillas de oro o las nanoestrellas de oro mostraron efectos sobre la viabilidad celular en ensayos MTT [33, 108], pero disminuyendo esta toxicidad al conjugar moléculas como polietilenglicol a las nanopartículas, evidenciando que la toxicidad encontrada es debido al agente estabilizante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [109].

En el caso de los NprO, se ha evaluado la toxicidad en líneas de células de cáncer gástrico GES-1 [32], cáncer mamario MCF-7 [33] y la línea celular VERO (células epiteliales de riñón de mono) [35]. Estos NprO no mostraron efectos sobre la viabilidad celular a las condiciones estudiadas en estos trabajos.

*Es por esta escasa información sobre la citotoxicidad de nanoprismas de oro y nula para el caso de enfermedades neurodegenerativas que se hace necesario e interesante el aumentar esta información pensando en una posible aplicación terapéutica.*

## Propuesta de trabajo

La propuesta de este proyecto es la formación de un sistema nanométrico basado en NprO, sintetizados con agentes de baja toxicidad para aplicaciones biológicas y con una banda de plasmón en la región de la NIR. Estos NprO están multifuncionalizados con PEGs y el péptido ANG2, de forma estable y no posee efectos sobre la viabilidad celular (Figura 10), para un potencial uso en diagnóstico y terapia de enfermedades como Alzheimer.



**Figura 10.** Resumen de la propuesta de trabajo. NprO (1) serán funcionalizados con distintos PEGs (A y B) (2). Los grupos COOH de los HS-PEG-COOH serán modificados mediante la reacción 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) (c) para obtener un enlace amida con el péptido ANG2 (D) (3). Para los nanosistemas (1), (2) y (3) se procederá a: a) caracterización fisicoquímica, b) evaluación de la estabilidad, y c) ensayos viabilidad celular.

## **Hipótesis**

“Nanoprismas de oro multifuncionalizados con Polietilenglicol y Angiopep-2 forman un sistema coloidal estable que no presenta efectos sobre la viabilidad celular en la línea SH-SY5Y”.

## **Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Evaluar la estabilidad coloidal y citotoxicidad de los nanoprismas de oro multifuncionalizados con PEG y ANG2.

### **2. Objetivos específicos**

1. Sintetizar y caracterizar nanoprismas de oro funcionalizados con PEG y ANG2.
2. Estudiar la estabilidad coloidal de nanoprismas de oro en medios de relevancia biológica (DMEM/F12 1% y PBS).
3. Evaluar la citotoxicidad de los nanosistemas obtenidos mediante ensayos MTS, azul de tripán, fluorescencia calceína y citometría de flujo, en la línea celular SH-SY5Y.

# Capítulo II

## Metodología

### 1. Sintetizar, conjugar y caracterizar los nanoprismas de oro desnudos y funcionalizados con PEG y ANG2.

Todo el material de vidrio utilizado en los experimentos detallados a continuación se lavó previamente con agua regia por 20 minutos, y todas las diluciones realizadas fueron con agua grado de pureza MILLI-Q.

#### 1.1. Síntesis de NprO

Para la obtención de NprO, se utilizó una metodología modificada de la descrita por Pelaz y cols. [35]. Una solución acuosa de oro ( $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 339,79 g/mol) fue reducida con una solución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 248,18 g/mol), ambos reactivos provistos por Sigma-Aldrich (>99,5%). La reacción se llevó a cabo con 4,17 mL de la solución de oro 2mM en un vial de vidrio, agregando rápidamente 5,0 mL de la solución de tiosulfato de sodio 0,625mM. El sistema reaccionó durante 9 minutos y posteriormente, se adicionaron 844  $\mu\text{L}$  de tiosulfato a la misma concentración. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y posterior a la segunda adición de tiosulfato de sodio se dejó reposar durante 60 minutos. Luego de ello, se realizaron caracterizaciones mediante espectroscopía UV-visible (UV-vis), dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta.

## **1.2. Conjugación de nanoprismas de oro con HS-PEG-Ome y HS-PEG-COOH**

Para conjugar los NprO con polietilenglicol, se utilizaron dos tipos de PEG (peso molecular de 5.000 g/mol aproximadamente, cada uno) provistos por Sigma-Aldrich, los cuales fueron disueltos en 200  $\mu$ L de agua. Los PEG están modificados con un extremo terminal metoxilo (Ome) o carboxilo (COOH), y en el otro extremo ambos poseen un grupo terminal tiol (SH). La masa total de PEG utilizada fue de 1 mg de PEGs por cada 10 mL de solución de prismas, según lo descrito por Pelaz y cols. [35], en una relación molar 1:3 de HS-PEG-Ome/HS-PEG-COOH. La solución de NprO obtenida en 1.1 se ajustó a un pH=10 y 0,25 mg de HS-PEG-Ome fueron agregados, la mezcla se agitó a 250 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 0,75 mg de HS-PEG-COOH y se dejó agitar por 3 horas. Finalmente se realizó una tercera adición de 0,5 mg de HS-PEG-COOH por 12 horas. Transcurrido el tiempo, la solución se distribuyó en volúmenes de 1 mL, y se centrifugó a 16.060 ref (g) para retirar el exceso PEG que no se unió a la superficie de los NprO. El precipitado obtenido de NprO-PEGs se resuspendió nuevamente en agua para ser caracterizado.

## **1.3. Enriquecimiento de nanoprismas de oro funcionalizados con PEGs**

El enriquecimiento de NprO-PEGs de los subproductos esféricos obtenidos desde la síntesis se realizó mediante una serie de centrifugaciones a distintas velocidades. La muestra fue repartida en tubos de centrífuga con 1 mL de solución y se centrifugó en primera instancia a 6080 g por 20 minutos, obteniendo el primer sobrenadante SN8000 (SN es sobrenadante y el número



es la velocidad de centrifugación en rpm) y resuspendiendo el precipitado en 1 ml de agua milli-Q, obteniendo el precipitado **pp1**. El pp1 resuspendido se centrifugó a 3420 g obteniéndose el **pp2** (sobrenadante SN6000, precipitado pp2), luego el pp2 resuspendido se centrifugó a 1520 g (sobrenadante SN4000, **pp3**) y finalmente a 380 g (sobrenadante SN2000, **pp4** o NprO-PEGs<sup>ENR</sup>). Cada centrifugación realizada por 20 minutos y resuspendiendo el precipitado obtenido en 1 mL de agua a excepción de la fracción final **pp4** que se resuspendió en 500  $\mu$ L de agua.

#### **1.4. Funcionalización de nanoprismas de oro-PEGs con ANG2**

La funcionalización con ANG2 se realizó centrifugando los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, descritos en 1.3, a 16060 g para obtener un precipitado que contiene los prismas concentrados, el cual se repartió en 3 tubos de centrífuga. A estos precipitados se les agregó una mezcla de N-(-3-dimetilaminopropil) carbodiimidahidroclorada y N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS), disuelto en *tampón MES* pH=5 (0,133 mg y 0,02 mg respectivamente en 1,2 mL de agua, 400  $\mu$ L por tubo) para activar los grupos carboxilos de HS-PEG-COOH. EDC y NHS fueron provistos por Sigma Aldrich. La mezcla se sonicó por 15 minutos y se centrifugó a 16.060 g para retirar las moléculas de EDC y NHS no unidas. A este precipitado, ya activado, se le agregaron 0,4 mg de ANG2 disueltos en 500  $\mu$ L de agua, la mezcla se traspasó a un vial de vidrio, manteniéndolo bajo agitación por 12 horas a 250 rpm. Transcurrido el tiempo, la solución se centrifugó a 16.060 g para retirar el sobrenadante con exceso de moléculas de ANG2 no unidas a los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Los precipitados de NprO-PEGs-ANG2 fueron resuspendidos en 1 mL de agua.

## **1.5. Caracterización fisicoquímica de los nanosistemas obtenidos**

### **1.5.1. Espectroscopía UV-Visible (UV-vis)**

Se determinó la banda del plasmón superficial de NprO, NprO-PEGs y NprO-PEGs-ANG2 mediante un espectrofotómetro LAMBDA 25 UV/VIS (Perkin Elmer), realizando un barrido entre 400 a 1100 nm. Las muestras se prepararon desde su obtención con una dilución de 2:3 (500  $\mu$ L totales) en cubeta plástica de 1 mL.

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

El diámetro hidrodinámico de los distintos nanosistemas se evaluó mediante DLS a 25°C utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*). Las muestras fueron preparadas diluyendo 50  $\mu$ L de la muestra desde su obtención con 450 $\mu$ L de agua. Para el tratamiento de datos, se consideraron solamente los datos obtenidos para las poblaciones con mayor porcentaje de área.

### **1.5.3. Potencial Zeta**

La carga superficial de los distintos nanosistemas fue determinada a 25°C utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*) a través del modelo de Smoluchowski. Las muestras utilizadas fueron las mismas del punto 1.5.2 con un ajuste de pH=8. Para el tratamiento de los datos, se

consideraron solamente los datos obtenidos para las poblaciones con mayor porcentaje de área.

#### 1.5.4. Cálculo de la concentración de nanoprismas de oro

Para determinar la concentración de los NprO se utilizó la técnica de absorción atómica y una ecuación utilizada para NvO que toma en cuenta las distintas dimensiones de estructuras anisotrópicas. Se colocaron 300  $\mu$ L de la muestra en un vial (x3) y se tapó con *parafilm* perforado, se dejó secar a 60°C durante 12 horas. Posteriormente se agregaron 5 mL de una solución ácida de HCl (1N) + HNO<sub>3</sub> (1N), y se dejó sellado durante 24 horas a 60°C para disolver completamente el Au contenido en los NprO, proceso comúnmente denominado digestión ácida.

Obtenido el valor de la concentración de oro presente (8,06 mg/L), se convirtió a unidades de molaridad con la masa molar de oro (196,97 mg/mmol) [C<sub>Au</sub>] = 0,04092 mmol/L. Con este dato se aplicó la siguiente fórmula modificada de la descrita en literatura [111]:

$$C_{NprO} = (4 \times C_{Au}) / (\rho_{Au} \times \pi \times (\sqrt{3}/4 \times L^2 \times h))$$

Donde:  $\rho_{Au}$  es la densidad del oro (59 átomos/nm<sup>3</sup>), C<sub>Au</sub> es la concentración de oro determinada por absorción atómica, W y L son el ancho y largo, respectivamente, de los NprO determinados por TEM.

Considerando que el volumen de agua en los 300  $\mu$ L de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> fue completamente evaporado, los 5 mL de la solución ácida se consideraron como el volumen total de la solución para el cálculo de la concentración final.

Obtenido el dato de la concentración de NprO, se realizó una curva de calibración para la muestra NprO-PEG<sup>ENR</sup> y se obtuvo un valor de coeficiente de extinción para NprO.

Un segundo método fue utilizado para determinar la concentración de NprO y fue el método escogido para los ensayos celulares de esta tesis. Para esto, se utilizó un equipo Nanosight NS300 (*Malvern Instruments*) que emplea el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). El solvente agua fue analizado en primer lugar para reportar si es que éste poseía partículas en suspensión, como medida de *background*. Las muestras fueron preparadas en una dilución 1:1000 desde su obtención. Se obtuvo la concentración expresada como nanopartículas/mL para la muestra de NprO-PEGs previo y posterior al enriquecimiento y mediante el uso del número de Avogadro  $6,022045 \times 10^{23}$ , se obtuvo la concentración en nanomoles por mL (nM). Obtenido el dato de concentración, se realizó una curva de calibración para la muestra NprO-PEG<sup>ENR</sup> y se obtuvo un valor de coeficiente de extinción para NprO.

### **1.5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (SEM)**

Con el fin de determinar el tamaño de los nanosistemas obtenidos, las muestras fueron observadas mediante TEM y SEM. Las imágenes fueron obtenidas en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en un microscopio JEOL JEM 1200 EX. Las muestras NprO, NprO-PEGs, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-ANG2 para ser estudiadas usando TEM, fueron preparadas dejando secar por 24 horas una gota (10  $\mu$ L) de solución 1:3 desde su obtención sobre grillas de cobre. Para el caso de SEM se dejó secar por 4 horas 100  $\mu$ L de solución obtenida sin diluir sobre

un alfiler de montaje para SEM, posterior a eso se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de la misma solución para aumentar la concentración de la muestra.

## **2. Evaluación de la estabilidad coloidal de nanoprismas de oro en medios de relevancia biológica**

### **2.1. Estabilidad en medio de cultivo DMEM/F12 1%**

Los ensayos de estabilidad en PBS fueron realizados diluyendo 200  $\mu\text{L}$  de las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-ANG2 en 800  $\mu\text{L}$  de DMEM/F12 (Suero Fetal Bovino al 1% y Penicilina al 1%) durante 0, 3, 8 y 24 horas a 37°C. Previamente a la caracterización por UV-vis, DLS y potencial zeta, las muestras se centrifugaron a 16060 g, resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de agua y sonicadas por 5 minutos para sus mediciones.

### **2.2. Estabilidad en Tampón fosfato salino (PBS)**

Los ensayos de estabilidad en PBS fueron realizados diluyendo 200  $\mu\text{L}$  de las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-ANG2 en 800  $\mu\text{L}$  de PBS 1X durante 0, 3, 8 y 24 horas a 37°C. Las muestras fueron caracterizadas usando UV-vis, DLS y potencial zeta a los distintos tiempos de estudio y previamente sonicadas por 5 minutos.

### **3. Evaluar la citotoxicidad del nanosistema NprO-PEGs-ANG2 en la línea celular SH-SY5Y**

#### **3.1. Ensayo de viabilidad celular MTS**

Mediante la reducción de la sal 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS), en presencia de PMS, a formazán, se evaluó la viabilidad de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y en presencia de NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, NprO-PEGs-ANG2 a distintas concentraciones (0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM). Se agregaron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se utilizó como medio de cultivo DMEM/F12 con 1% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina. El ensayo se realizó durante 24, 48 y 72 horas desde la incubación con las muestras dejando las células en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de ensayo, se descartó el medio y se incubaron las células con 80 µL de DMEM/F12 incoloro y 20 µL de solución MTS/PMS en cada pocillo durante 3 horas a 37°C. La medición colorimétrica se realizó a 490 y 655 nm en equipo BioTek's Synergy™ Mx Microplate Reader.

#### **3.2. Ensayo azul de tripán (TPB)**

Se evaluó la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y en presencia de NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, NprO-PEGs-ANG2 a distintas concentraciones (0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM). Se agregaron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se utilizó como medio de cultivo DMEM/F12 con 1% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina. El ensayo se realizó durante 24, 48 y 72 horas desde la incubación con las muestras dejando las células en una incubadora a 37°C

con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de ensayo, se descartó el medio y se agregaron 20 µL de tripsina 1X (Trip1x) por 2 minutos a 37° C en incubadora. Cumplido el tiempo se agregó 50 µL de DMEM/F12 1% SFB a los pocillos. Se tomaron alícuotas de 20 µL de cada muestra a las cuales se les añadió 20 µL de TPB, depositando los 40 µL resultantes sobre una cámara de Neubauer BOECO Germany y se procedió al conteo de las células por microscopía. El porcentaje de viabilidad celular se determinó dividiendo el número contado de células viables (transparentes) por el número total de células (transparentes más azules) y multiplicándolo por 100.

### **4.3. Imagenología y Fluorescencia por Calceína**

Mediante el uso del fluoróforo calceína (CALC) se evaluó la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y mediante imágenes por microscopía e intensidad de fluorescencia. Se incubaron 10.000 células en placas de 96 pocillos para fluorescencia, y se utilizó como medio de cultivo DMEM/F12 con 1% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina. La incubación con las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, NprO-PEGs-ANG2 a distintas concentraciones (0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM) fue de 24 horas con las células, mantenidas en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de ensayo, se descartó el medio y se incubaron las células con 80 µL de DMEM/F12 incoloro y 20 µL del fluoróforo calceína, con un tiempo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a realizar la imagenología en equipo OLYMPUS CKX41 con un láser verde. Por otro lado, para obtener un valor numérico se midió la intensidad de fluorescencia, se procedió a medir la placa a emisión de 515 y excitación 488 nm en equipo BioTek'sSynergy<sup>TM</sup> Mx Microplate Reader.

### 3.4. Citometría de flujo

Por citometría de flujo se evaluó la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y en presencia de NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, NprO-PEGs-ANG2 a distintas concentraciones (0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM). Se agregaron 50.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se utilizó como medio de cultivo DMEM/F12 con 1% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina. El ensayo se realizó durante 24 horas desde la incubación con las muestras dejando las células en una incubadora a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de ensayo, se descartó el medio y se incubaron las células con 80 µL de DMEM/F12 incoloro y 20 µL de solución del kit *LIVE/DEAD* que contiene 2 fluoróforos, CALC y homodímero de Etidio (HdE) por 15 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, se retiró el medio y se agregaron 100 µL de trip1x por pocillo, durante 2 minutos a 37° C. Transcurrido este tiempo, se procedió a centrifugar a 450 g y el precipitado resultado (células) se resuspendió en 200 µL del tampón de citometría de flujo FACS FLOW. Las mediciones fueron realizadas en equipo FACS Canto A de dos láseres y 6 colores marca BD, en Facility CEMC de la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

En el caso de todos los ensayos (3.1, 3.2, 3.3 y 3.4), se utilizaron controles de vida y de muerte, además de controles basales.



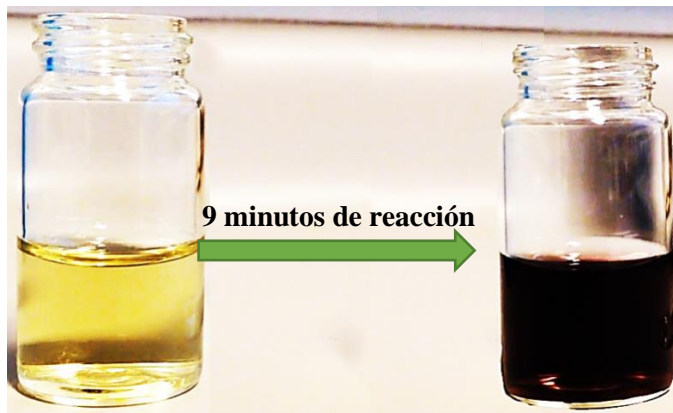
# Capítulo III

## Resultados y Discusión

### 1. Sintetizar, conjugar y caracterizar los nanoprismas de oro desnudos y funcionalizados con PEG y ANG2.

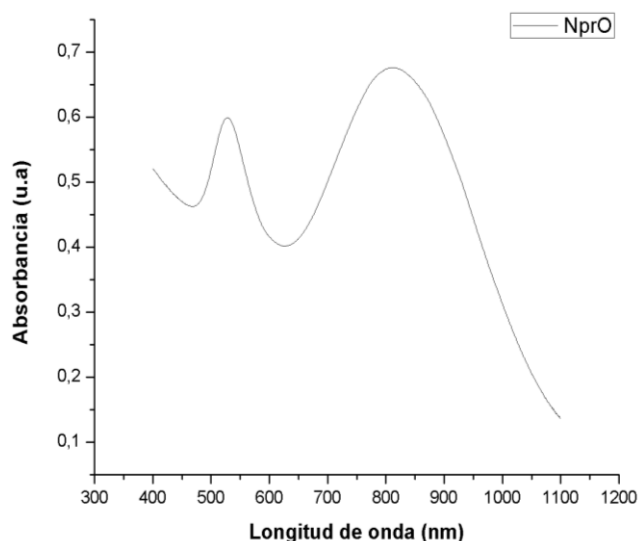
#### 1.1. Síntesis de nanoprismas de oro

Se obtuvieron NprO mediante la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  con tiosulfato de sodio, según punto 1.1 de la metodología. La síntesis llevada a cabo es reproducible a las concentraciones y condiciones señaladas y puede ser seguida a simple vista por un cambio en la coloración de la solución, de amarillo (característico de solución de  $\text{Au}^{+3}$ ) a morado intenso (característico de los NprO) transcurrido el tiempo de reacción (figura 11).

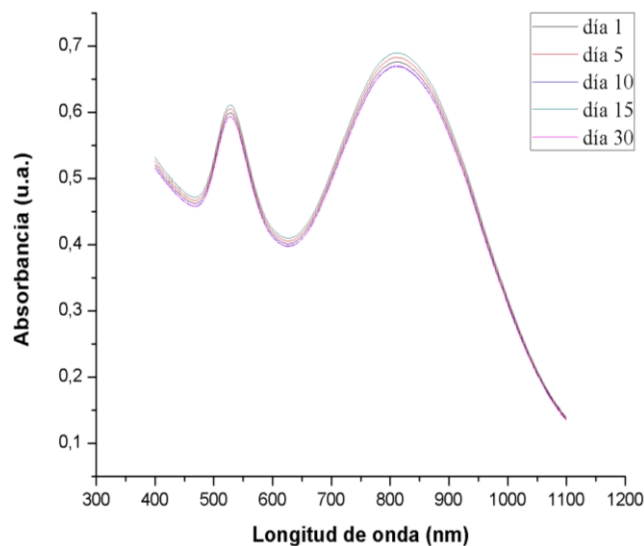


**Figura 11.** Cambio de color en la síntesis de NprO. La solución cambia desde un color amarillo ( $\text{Au}^{+3}$ ) a tiempo 0, a un color morado intenso (nanoprismas) transcurridos los 9 minutos de reacción.

Los estudios de espectroscopía UV-vis, mostraron un plasmón con un máximo de absorbancia a 810 nm correspondiente a prismas y un segundo máximo a 528 nm correspondiente a partículas esféricas producidas en la síntesis (figura 12). La estabilidad coloidal de los NprO obtenidos fue estudiada durante 5 semanas a 20°C por espectroscopia UV-vis-NIR. Mediante el estudio de los cambios en los máximos de absorbancia se pueden predecir modificaciones en la morfología y/o tamaño de las nanopartículas, así como acerca de la estabilidad coloidal por procesos de agregación. Los espectros (figura 13) no mostraron desplazamientos de las bandas de absorbancia, lo cual implica que el sistema permanece estable por al menos 30 días.

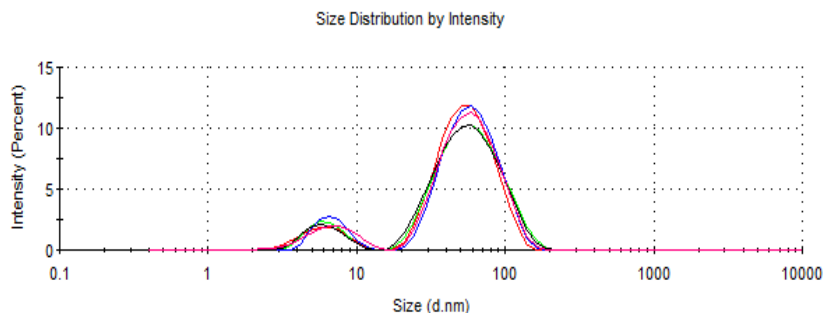


**Figura 12.** Espectro de absorción UV-vis de los NprO. Presentan un máximo de absorbancia a 810 nm (prismas) y un máximo de menor intensidad a 528 nm (partículas esféricas). Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q.

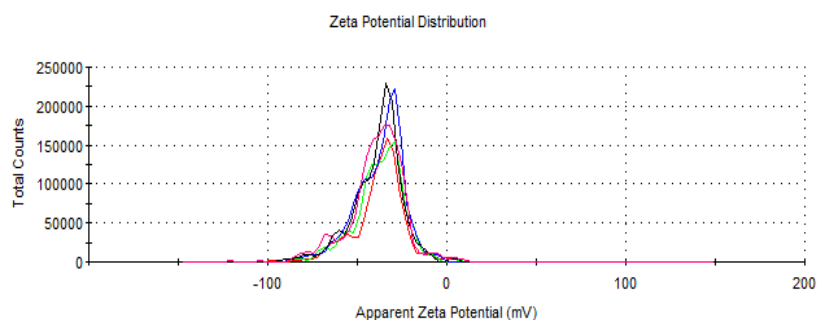


**Figura 13.** Estabilidad coloidal de los NprO desde su obtención. Espectros UV-vis-NIR obtenidos durante 5 semanas. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q y almacenadas a temperatura 20° C.

Mediante las técnicas de DLS y potencial zeta se obtuvieron los datos de tamaño hidrodinámico y de carga superficial, respectivamente. Estos datos fueron empleados como parámetro característico de las distintas etapas de conjugación y funcionalización del nanosistema (síntesis, conjugación, enriquecimiento, etc.). Los NprO obtenidos directamente de la síntesis poseen un diámetro hidrodinámico de  $52 \pm 2$  nm (figura 14), consecuente con el tamaño esperado para esta síntesis y los máximos de absorbancia obtenidos, usando UV-vis. La carga de  $-40 \pm 5$  mV (figura 15), se debe a la negatividad otorgada por los iones de sulfato producidos por la oxidación de tiosulfato en la síntesis y que permanecen adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

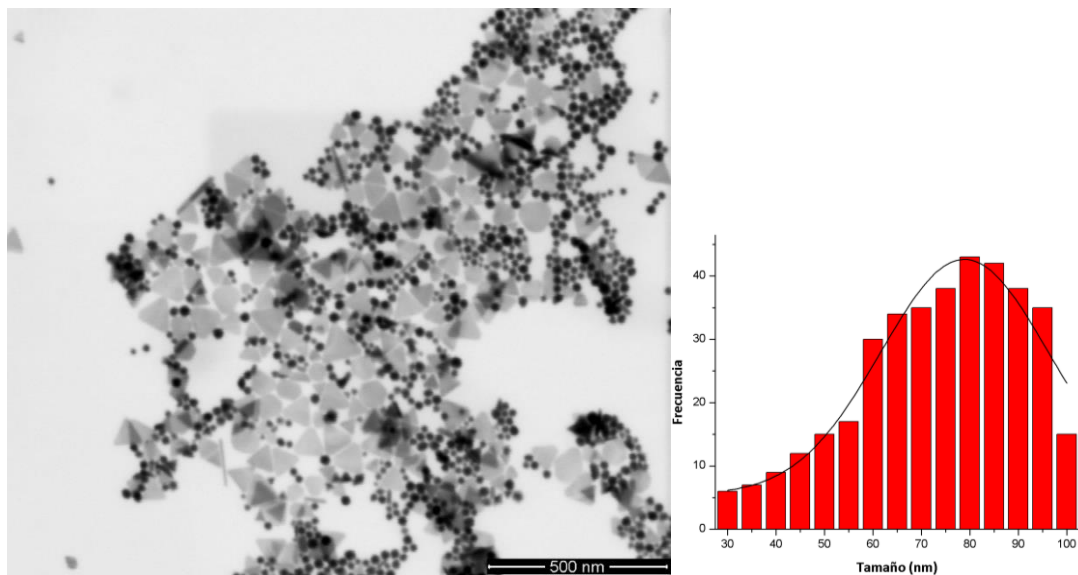


**Figura 14.** Distribución de tamaños por intensidad de los NprO. Se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 50 nm y de 8 nm para partículas esféricas (Polidispersidad de poblaciones: 0,5348). Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q.

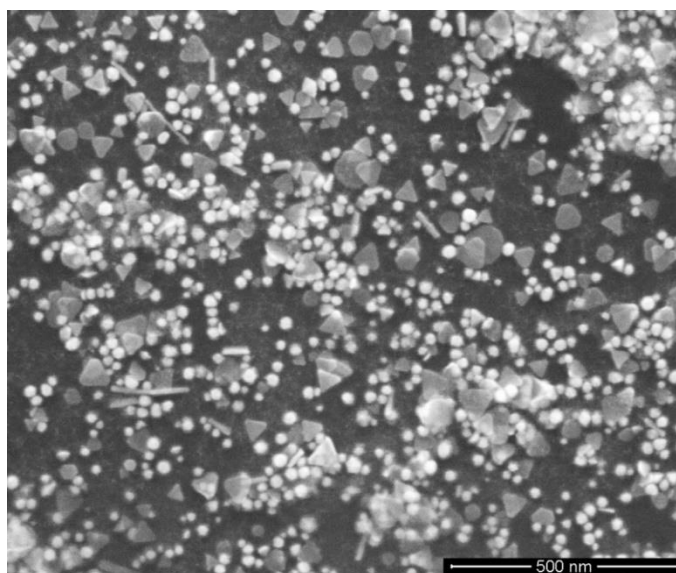


**Figura 15.** Gráfico de los potenciales zeta de los NprO. Se obtuvo un valor de carga superficial de -40 mV en promedio. Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q y pH=8.

Finalmente, por microscopía TEM (figura 16) y SEM (figura 17) se obtuvieron imágenes de los NprO. Se realizó un histograma para determinar la distribución de tamaños de las partículas, siendo en promedio de  $79 \pm 1$  nm de diámetro, para los prismas y de  $15 \pm 5$  nm para partículas esféricas. Cabe destacar que, además, se observó la aglomeración de ambas estructuras en las imágenes TEM y SEM obtenidas.



**Figura 16.** Imagen TEM de NprO. Ajustada a una escala de 500 nm, observándose las poblaciones de NprO (35%) con un tamaño promedio de 79 nm y de partículas esféricas (65%) con 15 nm. 10  $\mu$ L de muestra diluida 1:3 en agua MILLI-Q.



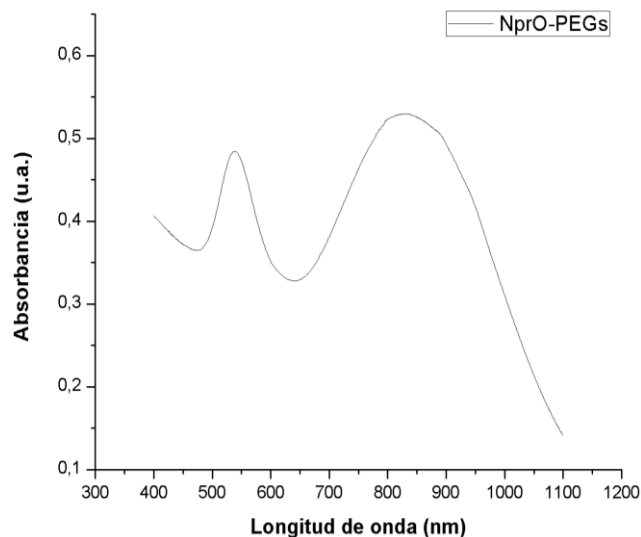
**Figura 17.** Imagen SEM de NprO. Ajustada a una escala de 500 nm, observándose las poblaciones de NprO (35%) con un tamaño promedio de 79 nm y de partículas esféricas (65%) con 15 nm. 100  $\mu$ L de muestra sin diluir desde su obtención.

Mediante el protocolo de síntesis propuesto en esta tesis, se logró obtener NprO que poseen un plasmón entre 800 y 900 nm determinado por espectroscopía

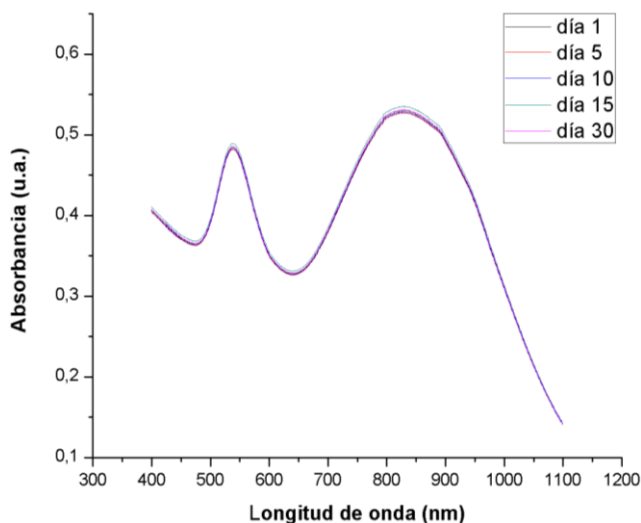
UV-vis, que es la zona del infrarrojo cercano donde los tejidos absorben poco y la energía de un láser puede penetrar directo a las nanopartículas para excitarlas y producir hipertermia local, haciendo seguro el uso de estos NprO para potenciales terapias. Por DLS y potencial zeta se mostró un diámetro hidrodinámico de 52 nm para prismas y 14 nm para esferas, con una carga superficial promedio de -40 mV, negativa debido a las moléculas de tiosulfato y sulfato de sodio. El tamaño obtenido por TEM y por SEM fue de 79 nm en promedio y se registró que, del total de la población, un 35% corresponde a prismas y un 65% a esferas, siendo en relación con átomos de oro totales utilizados en la síntesis de 92% y 8% respectivamente.

## **1.2. Conjugación de nanoprismas de oro con HS-PEG-OMe y HS-PEG-COOH**

La conjugación de los NprO con ambos tipos de PEG, HS-PEG-Ome y HS-PEG-COOH, se evaluó por espectroscopia UV-vis-NIR (figura 18) obteniéndose espectros con un máximo a 830 nm y 538 nm. Se evaluó su estabilidad coloidal por cinco semanas (figura 19), sin observar cambios en la posición del plasmón de prismas. Respecto a los NprO desnudos (Figura 12), se observó un desplazamiento del plasmón hacia el rojo del espectro de absorbancia (810 a 830 nm). Lo cual se correlaciona con un proceso de quimisorción de las moléculas de PEG que conduce a un cambio del índice de refracción y a un desplazamiento de la banda plasmónica hacia mayores longitudes de onda, proceso denominado desplazamiento batocrómico [110].



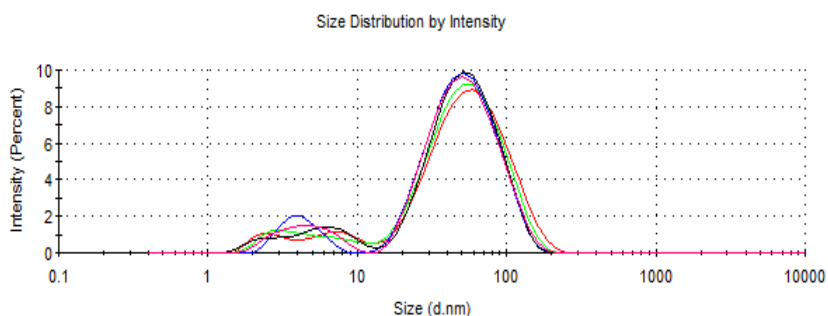
**Figura 18.** Espectros de absorción UV-vis de NprO-PEGs. Presentan un desplazamiento hacia el rojo del espectro posterior a la conjugación con PEG con un máximo de prismas a 830 nm y un máximo de partículas esféricas a 538 nm. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q.



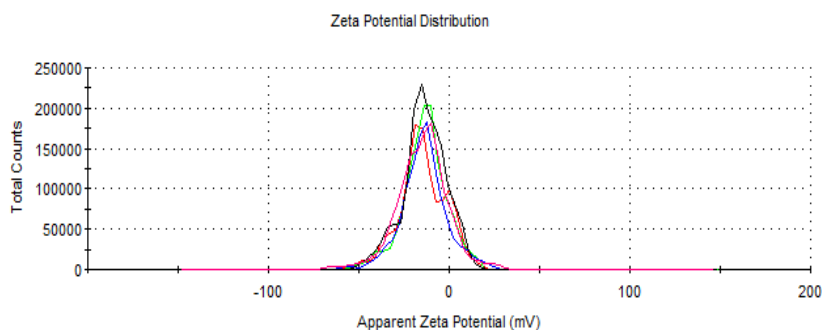
**Figura 19.** Estabilidad coloidal de los NprO-PEGs. Espectros UV-vis obtenidos durante 5 semanas. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q y almacenadas a temperatura 20° C.

Por su parte, el diámetro hidrodinámico fue evaluado por DLS (figura 20) y la carga superficial por potencial zeta (figura 21), obteniendo valores de  $65 \pm 3$  nm y  $-22 \pm 2$  mV respectivamente. El aumento del diámetro hidrodinámico observado se correlaciona con el aumento de volumen del sistema debido a la

quimisorción de las moléculas de PEGs sobre los NprO y el cambio en los valores de potencial zeta respecto a los NprO sin PEGs puede atribuirse al reemplazo de las moléculas de tiosulfato y sulfato de sodio que presentan 2 cargas negativas por moléculas de PEG neutras como HS-PEG-Ome o con solo una carga negativa, HS-PEG-COOH, disminuyendo así la carga superficial de cada partícula.



**Figura 20.** Distribución de tamaños de NprO-PEGs. Se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 65 nm para prismas y 7 nm para partículas esféricas (Polidispersidad: 0,4). Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q.

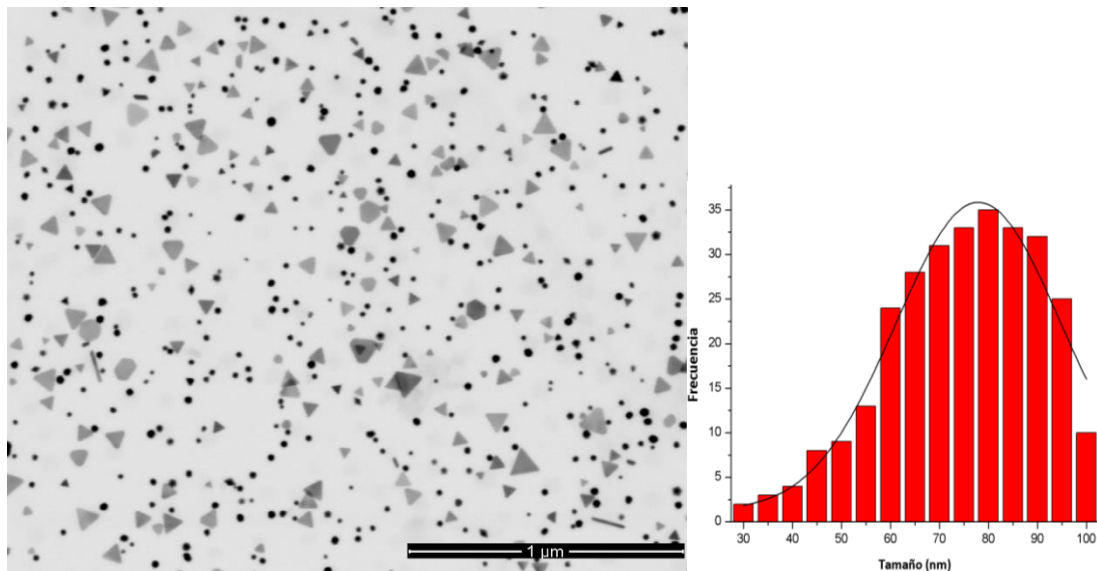


**Figura 21.** Gráfico de potenciales zeta de NprO-PEGs. Se obtuvo un valor de carga superficial de -22 mV en promedio. Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q y pH=8.

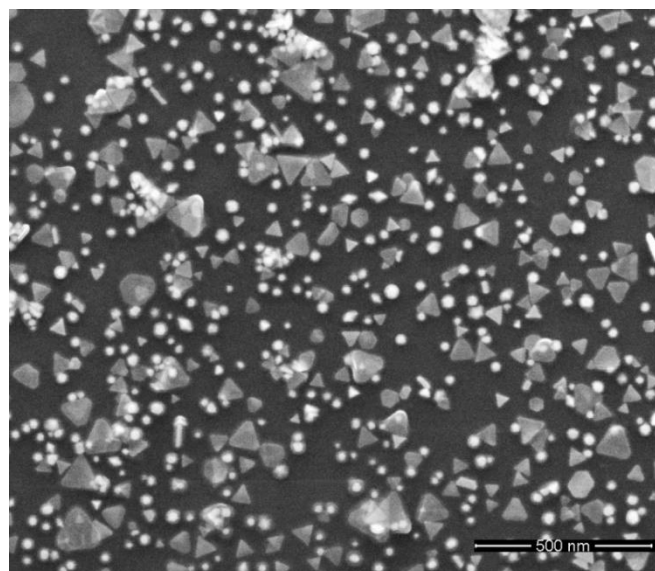
Las imágenes por microscopía TEM (figura 22) y SEM (figura 23) para los NprO-PEGs, mostraron un tamaño promedio  $78 \pm 1$  nm para prismas y de  $14 \pm 5$  nm para partículas esféricas, además de mostrar que las poblaciones presentes



están más separadas y no tan aglomeradas como en el caso de los NprO sin recubrimiento con PEGs (figura 17).



**Figura 22.** Imagen TEM de NprO-PEGs. Ajustada a una escala de 1 μm, observándose las poblaciones de NprO (35%) con un tamaño promedio de 78 nm y de partículas esféricas (65%) con 14 nm. 10 μL de muestra diluida 1:3 en agua MILLI-Q.



**Figura 23.** Imagen SEM de NprO-PEGs. Ajustada a una escala de 500 nm, observándose las poblaciones de NprO (35%) con un tamaño promedio de 78 nm y de partículas esféricas (65%) con 14 nm. 100 μL de muestra sin diluir desde su obtención.

Un aspecto destacable es que el aumento del diámetro hidrodinámico va acompañado de una disminución en el índice de polidispersidad de la muestra, el cual es un índice de la homogeneidad de tamaño de las nanopartículas presentes en la solución. En relación con la carga superficial medida por potencial zeta, se observó una disminución de los NprO-PEGs (-22 mV), con respecto a las NprO (-40 mV), lo cual es debido al remplazo de las moléculas de tiosulfato de sodio, las cuales poseen 2 cargas negativas puntuales, por el HS-PEG-OMe que no posee cargas formales y por HS-PEG-COOH que posee solo 1 carga formal. Indicando de esta forma la unión de las moléculas de PEGs a los NprO. Este cambio en la carga superficial del nanosistema resulta favorable pensando en posibles terapias, puesto que, al tener menor negatividad en su superficie, estas nanopartículas se vuelven menos propensas al reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear [53].

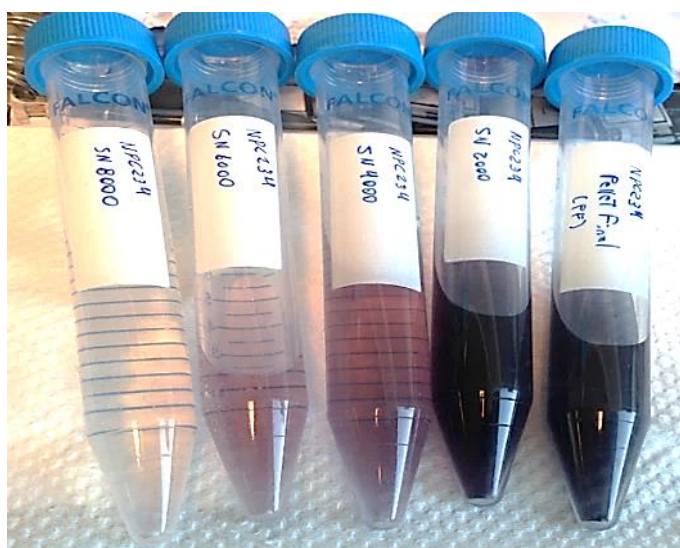
Por lo tanto, mediante el aumento en el diámetro hidrodinámico y la disminución de la negatividad en la carga superficial, es que se logró conjugar moléculas de PEGs a los NprO exitosamente.

### **1.3. Enriquecimiento de nanoprismas de oro con PEGs**

La síntesis de NprO por el protocolo propuesto en este trabajo produce prismas de tamaños diversos y un gran número de nanopartículas de forma esférica (centros de nucleación). Con la finalidad de disminuir la polidispersión de tamaños y remover las estructuras esféricas, fue necesario enriquecer la solución coloidal. La banda de plasmón en los espectros UV-vis-NIR que corresponden a la longitud de onda de 530 nm se correlaciona directamente con

el grosor de los prismas y a la presencia de esferas que absorben también a esta longitud de onda.

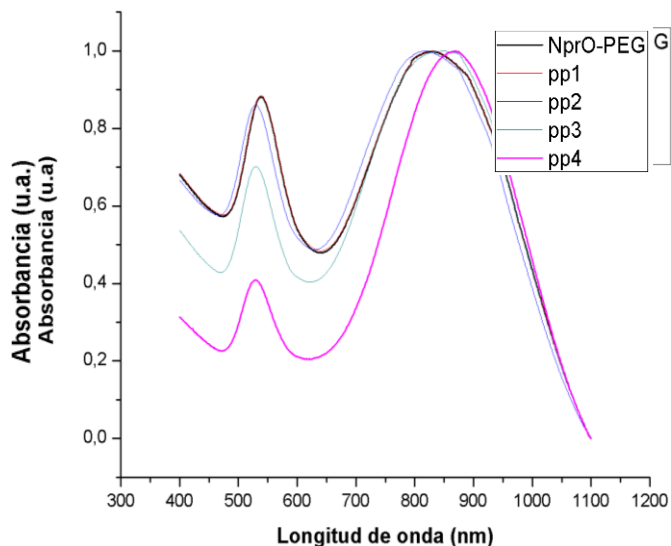
Para lograr una separación según tamaños de las distintas poblaciones de prismas y esferas, se realizó un protocolo centrifugaciones a distintas velocidades (metodología 1.3.) de las muestras NprO-PEGs. Los sobrenadantes obtenidos de las distintas centrifugaciones realizadas mostraron un color que va aumentando de incoloro hasta un color morado para el último sobrenadante, dando cuenta de la remoción de partículas de menor tamaño respecto a la población general de prismas en las distintas etapas hasta obtener el precipitado final pp4 que contiene a los NprO-PEGs<sup>ENR</sup> (figura 24).



**Figura 24.** Sobrenadantes del enriquecimiento de NprO-PEGs. De izquierda a derecha se observa el sobrenadante SN8000 de la primera centrifugación (incoloro) hasta el último sobrenadante SN2000 (morado) y finalmente el precipitado pp4 resuspendido en agua.

Se obtuvieron los espectros UV-vis de los diferentes precipitados provenientes de las distintas centrifugaciones de NprO-PEGs y se normalizaron a un valor de 1 para el máximo de absorbancia de prismas para comparar el

desplazamiento en las bandas de prismas y la disminución en la banda de esferas (figura 25).



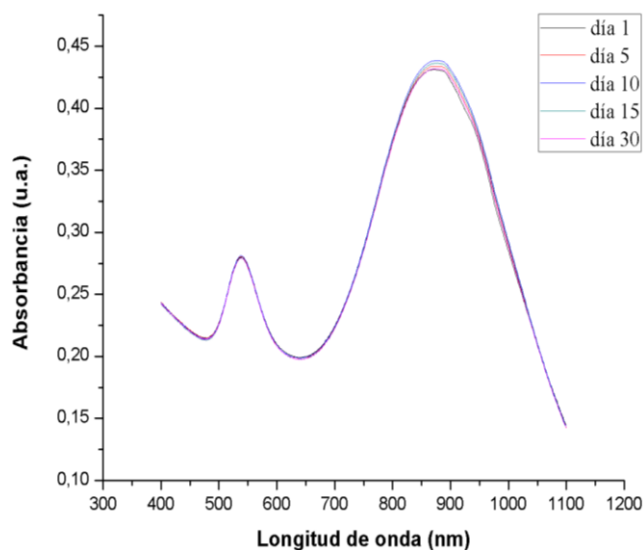
**Figura 25.** Espectros U.V-vis normalizado de las distintas fracciones de la separación de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. El pp4 (rosado) es la fracción correspondiente a NprO-PEGs<sup>ENR</sup> con un máximo de absorbancia a 870 nm. En negro se señala la muestra previa al enriquecimiento con máximo de absorbancia a 830 nm. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q y valores normalizados a un máximo de absorbancia de 1.

Se observa que cada fracción posee un máximo de absorción característico a una longitud de onda, que va desde los NprO-PEGs a 830 nm hasta NprO-PEGs<sup>ENR</sup> a 870 nm. A su vez, se observa una disminución del máximo correspondiente a esferas (530 nm) en la fracción final de los prismas obtenidos (pp4). Los datos de la razón entre el máximo de absorbancia de ambos plasmones, que da cuenta de la disminución de esferas en la muestra, se obtuvieron desde la obtención de los NprO hasta el enriquecimiento de NprO-PEGs y se resumen en la tabla 1.

Muestra	Razón prismas/esferas
NprO	1,08
NprO-PEGs	1,10
pp1	1,09
pp2	1,12
pp3	1,24
pp4	1,61

**Tabla 1.** Valores de la razón prismas/esferas. La razón entre los máximos de absorbancia de prismas y esferas para las muestras NprO, NprO-PEGs, pp1, pp2, pp3 y pp4.

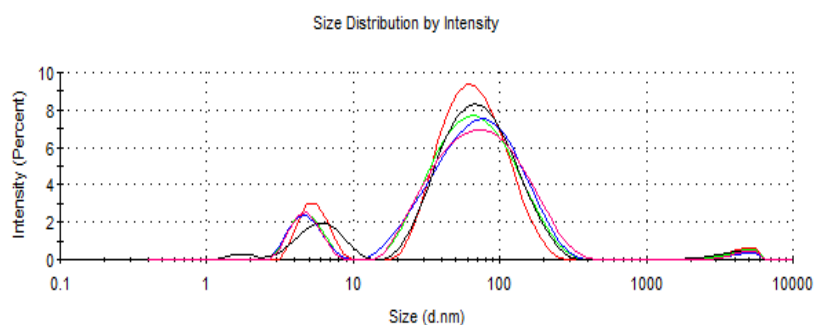
La estabilidad coloidal de la muestra enriquecida NprO-PEGs<sup>ENR</sup> fue realizada durante cinco semanas desde su obtención y se evaluó por espectroscopía UV-vis como muestra la figura 26.



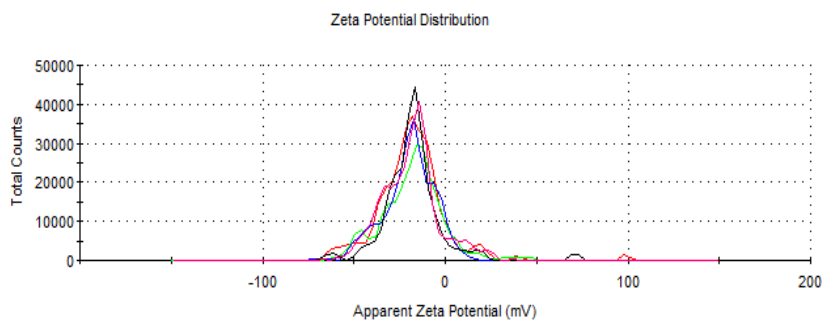
**Figura 26.** Estabilidad coloidal de los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Espectros UV-vis obtenidos durante cinco semanas. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q y almacenadas a temperatura 20° C.

El diámetro hidrodinámico obtenido para los NprO-PEGs<sup>ENR</sup> fue de  $80 \pm 6$  nm (figura 27) y su carga superficial fue de  $-20 \pm 2$  mV (figura 28). El aumento de tamaño es debido a que, en cada centrifugación realizada, la fuerza de centrifugación (velocidad) fue disminuyendo y a medida que esta es menor, las

partículas que son capaces de sedimentar por esta velocidad son exclusivamente las de tamaños mayores. Respecto a la carga, las partículas de mayor tamaño suelen tener una carga mayor ya sea positiva o negativa. En este caso no hubo una variación significativa, demostrando que el sistema se mantiene estable con la carga otorgada por PEGs (-22 a -20 mV).



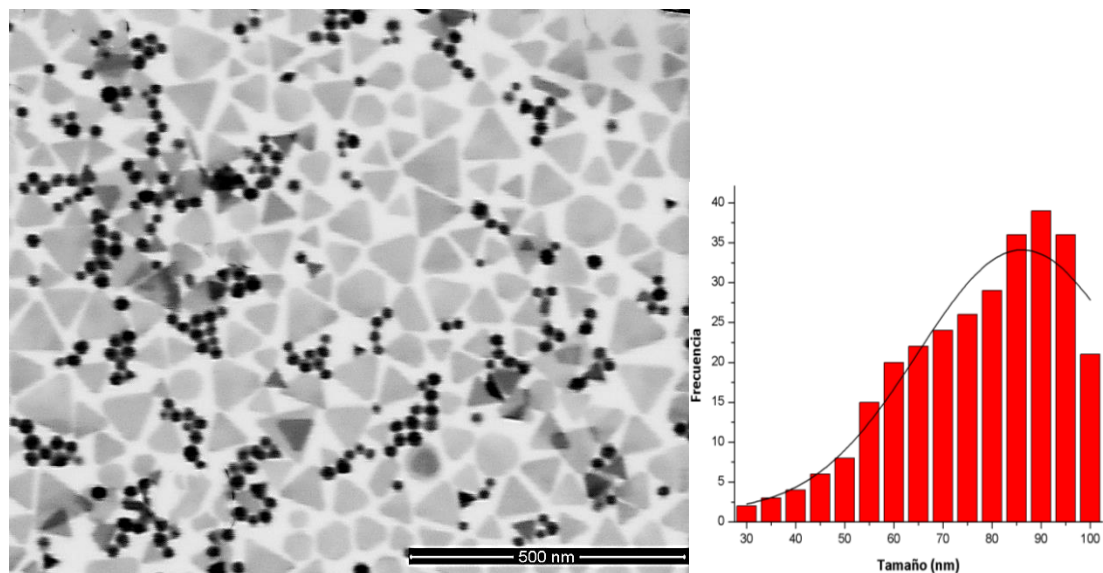
**Figura 27.** Distribución de tamaños de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 80 nm para prismas y 7 nm para partículas esféricas (Polidispersidad: 0,4). Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q.



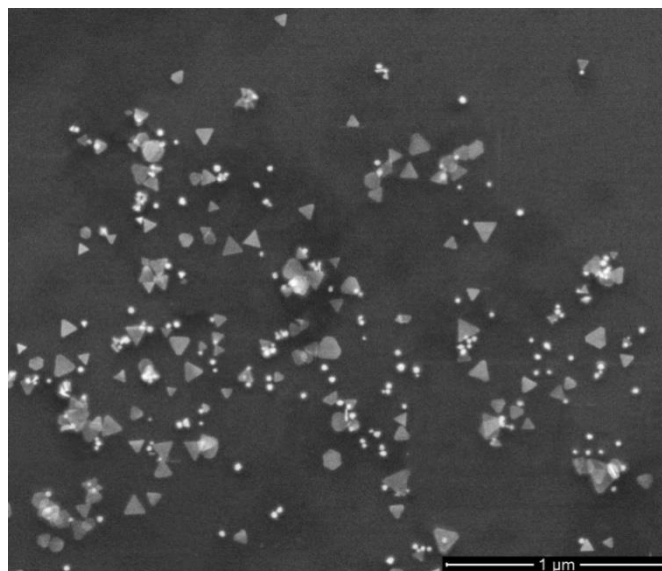
**Figura 28.** Gráfico de potenciales zeta de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Se obtuvo un valor de carga superficial de -20 mV en promedio. Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q y pH=8.

Las imágenes obtenidas por microscopía TEM (figura 29) y SEM (figura 30) para los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, mostraron un tamaño promedio  $87 \pm 2$  nm para nanoprismas. Este mayor tamaño promedio observado corrobora lo observado

por UV-vis, DLS y potencial zeta, debido al proceso de centrifugaciones en el enriquecimiento.



**Figura 29.** Imagen TEM de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Ajustada a una escala de 500nm, observándose las poblaciones de NprO (52%) con un tamaño promedio de 87 nm y de partículas esféricas (48%) con 14 nm. 10  $\mu$ L de muestra diluida 1:3 en agua MILLI-Q.



**Figura 30.** Imagen SEM de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Ajustada a una escala de 1 $\mu$ m, observándose las poblaciones de NprO (52%) con un tamaño promedio de 87 nm y de partículas esféricas (48%) con 12 nm. 100  $\mu$ L de muestra sin diluir desde su obtención.

Así, el nanosistema NprO-PEGs<sup>ENR</sup> obtenido presentó un desplazamiento en el espectro UV-vis de 870 nm, respecto de los NprO-PEGs (830 nm). Esto es acorde al tamaño de las nanopartículas que van quedando en cada fracción.

La caracterización por DLS y potencial zeta arrojó valores de diámetro hidrodinámico 80 nm y una carga superficial de -18 mV. Este aumento en el tamaño se condice con el protocolo utilizado, y la disminución en la polidispersidad (0,45 a 0,42) lo que da cuenta de la eliminación de las esferas en la solución. El tamaño obtenido por TEM fue de 87 nm para prismas, representando un 52% de la población total. Para partículas esféricas se obtuvo un tamaño de 14 nm promedio, siendo el 48% restante de la población.

Por otra parte, con la finalidad de conocer el rendimiento del enriquecimiento por centrifugación realizado, se calculó el porcentaje de oro presente en cada tipo de NPO (prismas y esferas) en muestras sin enriquecer (NprO-PEGs) y muestras enriquecidas (NprO-PEGs<sup>ENR</sup>).

La densidad de oro metálico ( $\rho_{Au0}$ ) es de 59 átomos/nm<sup>3</sup> [92], y mediante el uso de los tamaños determinados por TEM y las fórmulas de los volúmenes para cada tipo de partícula se obtuvo el número de átomos de Au<sup>0</sup> en cada uno:

$$V_{NprO} = \sqrt{3}/4 \times L^2 \times h ; V_{NeO} = 4/3 \times \pi \times r^3$$

Donde, “L” es el largo de los prismas, “h” es la altura o grosor de estos y “r” es el radio de las esferas. Los volúmenes obtenidos de la muestra NprO-PEGs fueron de 32.168 nm<sup>3</sup> y 1.437 nm<sup>3</sup> para prismas y esferas, respectivamente. Así mediante la densidad, se obtuvo que el número de átomos para prismas fue de 1.897.912 y para esferas de 84.783. Luego, considerando que las esferas en esta muestra representaban un 65% de la población, es que el oro total en NeO fue

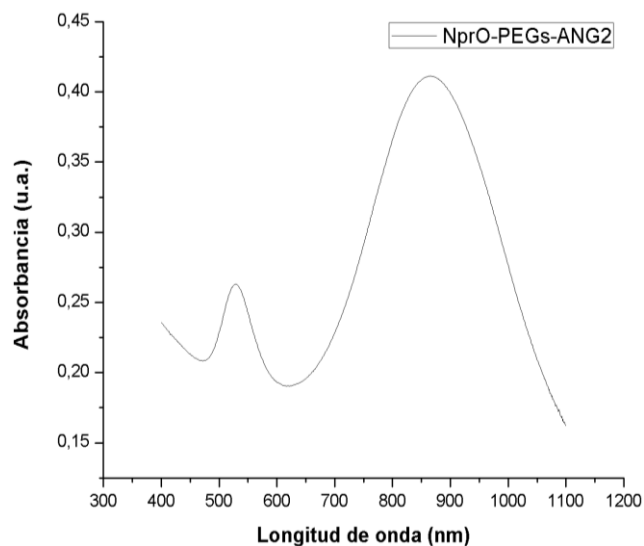


de un 8% respecto al Au<sup>0</sup> total. Para el caso de los prismas, siendo estos un 35% de la población, los átomos de Au<sup>0</sup> fueron un 92% de la cantidad de Au<sup>0</sup> total en la muestra.

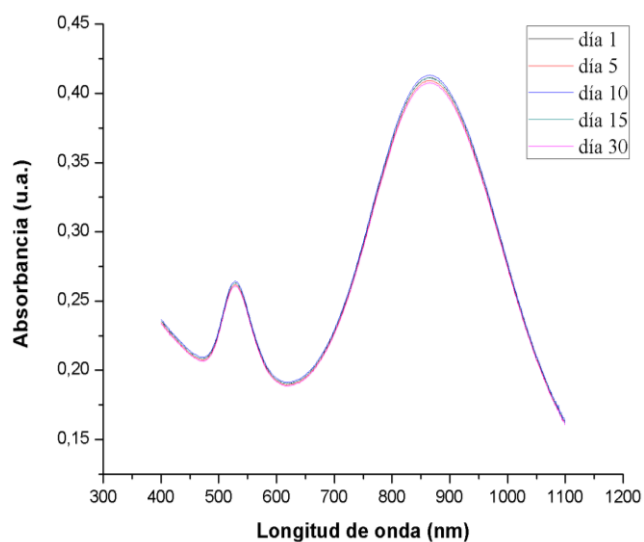
Mediante el mismo razonamiento se obtuvo que los NprO luego del enriquecimiento, representaron un 96% respecto del Au<sup>0</sup> total en la muestra NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, y las nanoesferas de oro el 4% restante.

#### **1.4. Funcionalización de nanoprismas de oro-PEGs con ANG2**

Al sistema NprO-PEGs<sup>ENR</sup> se le agregó el péptido ANG2 mediante la reacción de activación de grupos carboxílicos con la mezcla EDC/NHS, obteniendo el nanosistema NprO-PEGs-ANG2. Se evaluó mediante espectroscopia UV-vis su obtención (figura 31) y su estabilidad coloidal por cinco semanas (figura 32). Se pudo observar que posterior a la funcionalización con ANG2, el sistema tuvo un leve desplazamiento en el espectro UV-vis hacia la izquierda desde los 870 nm a los 867 nm respecto de los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Este fenómeno se conoce como efecto hipsocrómico y puede ocurrir por un cambio en el medio que rodea a la molécula, cambiando el pH, el disolvente o los ligandos de coordinación [110]. Otro factor es la disminución en la polidispersidad de las poblaciones que cambió desde 0.4241 para NprO-PEGs<sup>ENR</sup> a 0,4034 para NprO-PEGs-ANG2, debido a las centrifugaciones en el protocolo de funcionalización, eliminando poblaciones agregadas de mayor tamaño.



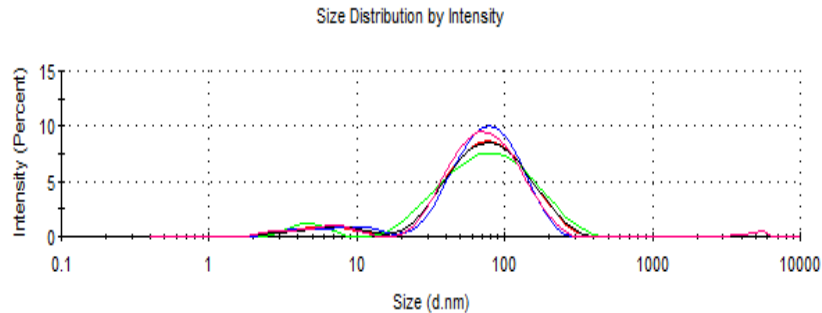
**Figura 31.** Espectros de absorción UV-vis de NpO-PEGs-ANG2. Presentan un máximo de prismas a 865 nm y un máximo de partículas esféricas a 529 nm. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q.



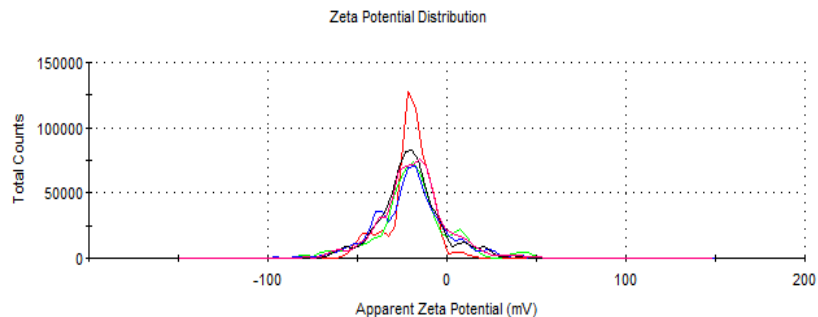
**Figura 32.** Estabilidad coloidal de NprO-PEGs-ANG2. Espectros UV-vis obtenidos durante cinco semanas. Muestras diluidas en relación 2/3 en agua MILLI-Q y almacenadas a temperatura 20° C.

Además, se obtuvo por DLS (figura 33) un diámetro hidrodinámico de  $84 \pm 4$  nm y por potencial zeta (figura 34) se obtuvo una carga superficial de  $-14 \pm 1$  mV. El aumento en el diámetro hidrodinámico es acorde a lo esperado por la unión de nuevas moléculas al sistema, aunque la cantidad de ANG2 no es

suficiente para aumentar este tamaño de manera significativa. Con respecto a la disminución de la negatividad del nanosistema, es consecuente con la unión del péptido ANG2 a la superficie, ya que este posee dos cargas positivas totales al pH de estudio, disminuyó la carga superficial acercándose a la neutralidad.

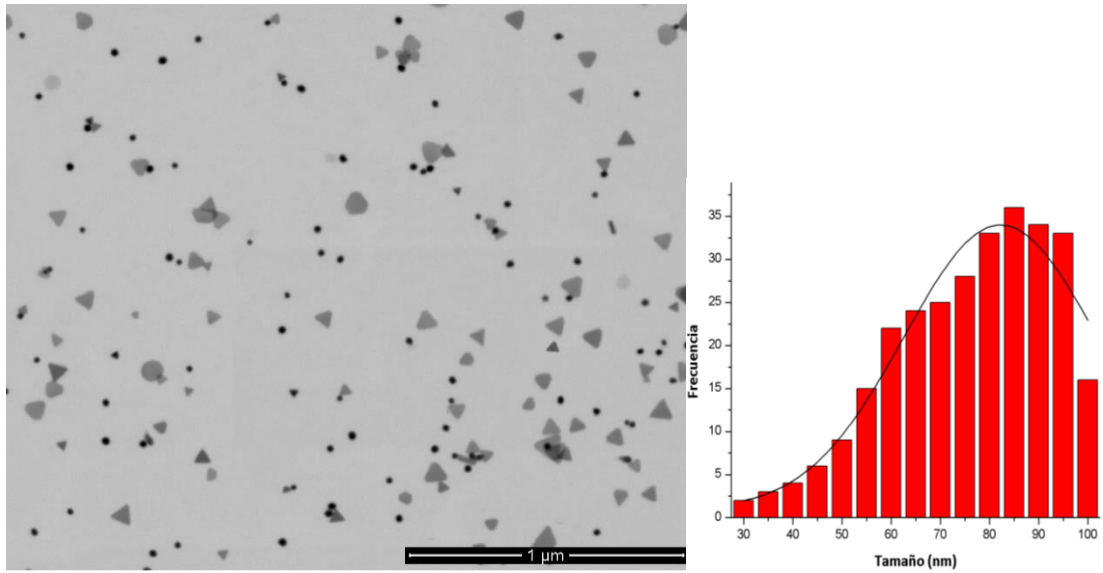


**Figura 33.** Distribución de tamaños de NprO-PEGs-ANG2. Se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 84 nm para prismas y 8 nm para partículas esféricas (Polidispersidad: 0,4). Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q.

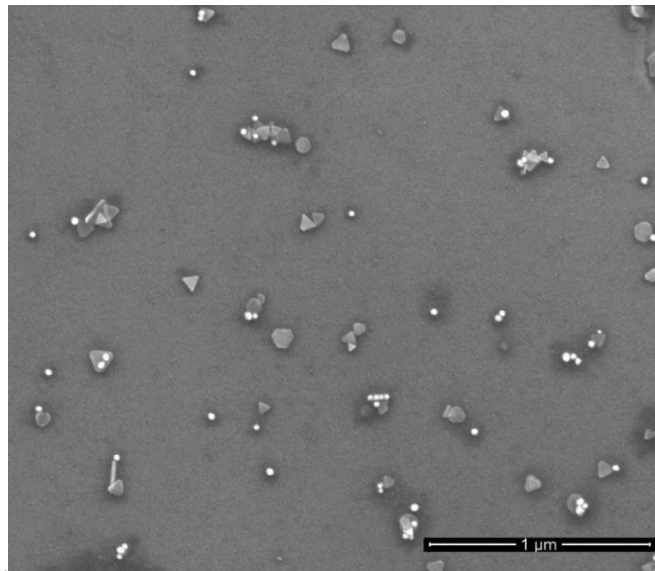


**Figura 34.** Gráfico de potenciales zeta de NprO-PEGs. Se obtuvo un valor de carga superficial de -20 mV en promedio. Tamaño promedio de 5 medidas realizadas. Muestras diluidas en relación 1/10 en agua MILLI-Q y pH=8.

Las imágenes obtenidas por TEM (figura 35) y SEM (figura 36) para los NprO-PEGs-ANG2 mostraron un tamaño promedio de  $84 \pm 2$  nm para prismas y  $13 \pm 1$  nm para esferas.



**Figura 35.** Imagen TEM de NprO-PEGs-ANG2. Ajustada a una escala de 1 µm observándose las poblaciones de NprO (50%) con un tamaño promedio de 84 nm y de partículas esféricas (50%) con 13 nm. 10 µL de muestra diluida 1:3 en agua MILLI-Q.

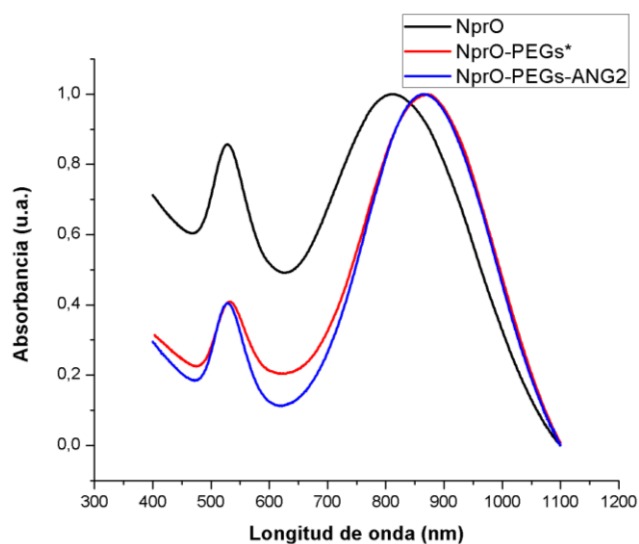


**Figura 36.** Imagen SEM de NprO-PEGs-ANG2. Ajustada a una escala de 1 µm observándose las poblaciones de NprO (50%) con un tamaño promedio de 84 nm y de partículas esféricas (50%) con 13 nm. 100 µL de muestra sin diluir desde su obtención.

La carga superficial mostrada con un valor de -14 mV, desde los -20 mV sin la adición del péptido, es atribuida a la modificación de los grupos carboxilo del PEG con el péptido angiopep-2 a través de la reacción EDC/NHS formando así

enlaces amida, ya que este péptido posee una carga neta de +2 al pH estudiado. Estos datos en conjunto lograron confirmar la unión del péptido ANG2 a los NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, obteniéndose el nanosistema final NprO-PEGs-ANG2.

Las diferencias de los datos obtenidos en la caracterización por UV-vis, DLS, potencial zeta y TEM durante las distintas etapas de la conjugación y funcionalización de los NprO, con PEGs y ANG2 se muestran de manera resumida en la figura 37 donde se observan los espectros de absorbancia UV-vis y en la tabla 2 que muestra los datos ordenados de máximos de absorbancia de sus plasmones, diámetro hidrodinámico, carga superficial y tamaños obtenidos por TEM.



**Figura 37.** Resumen espectros UV-vis. Absorbancia normalizada al valor de 1 para el máximo de absorbancia. Comparación de la posición del plasmón de NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2.

Muestra	plasmón prismas (nm)	Plasmón esferas (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Carga superficial (mV)	Tamaño TEM (nm)
NprO	<b>810</b>	<b>528</b>	<b>52 ± 2</b>	<b>-40 ± 4</b>	<b>79 ± 1</b>
NprO-PEGs	<b>830</b>	<b>538</b>	<b>65 ± 3</b>	<b>-22 ± 2</b>	<b>78 ± 1</b>
NprO-PEGs <sup>ENR</sup>	<b>870</b>	<b>531</b>	<b>80 ± 6</b>	<b>-20 ± 2</b>	<b>87 ± 2</b>
NprO-PEGs-ANG2	<b>867</b>	<b>529</b>	<b>84 ± 4</b>	<b>-14 ± 1</b>	<b>84 ± 2</b>

**Tabla 2.** Resumen datos UV-vis, DLS, potencial zeta y TEM. Comparación de las caracterizaciones de NprO, NprO-PEGs, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2.

## 1.5. Cálculo de la concentración de nanoprismas de oro

### 1.5.1. Determinación mediante absorción atómica

Para poder determinar la concentración de las muestras utilizadas en los ensayos celulares, se realizaron dos métodos experimentales. El primero fue mediante la determinación de la concentración de oro contenida en muestras NprO-PEGs<sup>ENR</sup> por absorción atómica (metodología 1.5.4.), la cual fue de 8,06 mg/L. Posteriormente mediante el uso de una ecuación descrita y utilizada en literatura para determinar la concentración de nanopartículas de oro [92], se calculó la concentración de NprO en la muestra (0,162 nM) y se realizó una curva de calibración con concentraciones decrecientes desde los 0,162 nM. Con los datos obtenidos de las absorbancias de las muestras por espectroscopía UV-vis es que se realizó un gráfico de absorbancia v/s concentración con los datos de la tabla 1s (anexo), obteniendo un comportamiento lineal y una ecuación de

la recta (figura 1s de anexo), cuya pendiente representa el coeficiente de extinción según la ley de Beer-Lambert ( $A = \epsilon \times c \times l$ ), donde “A” es la absorbancia, “ $\epsilon$ ” es el coeficiente de extinción y “l” es la longitud de la celda que es igual a 1 en estos casos.

Finalmente, mediante espectrometría se obtuvo el coeficiente de extinción de  $\epsilon = 16,419$ . Con este valor según la ley de Beer-Lambert se puede obtener la concentración (nM) de una muestra de NprO.

El inconveniente que presenta este método es que este consta de varios pasos previos hasta la obtención del dato final. Es así, como la digestión ácida de las muestras o la evaporación de su solvente, pueden llevar a errores por una pérdida de oro en estos procesos (oro que no haya sido removido de las paredes del vial por el ácido, o que se haya evaporado un porcentaje de la muestra junto con el solvente). Además, un factor muy importante a considerar es que la fórmula utilizada para determinar la concentración de los NprO solo considera soluciones monodispersas o con baja polidispersidad. Además, el porcentaje de nanopartículas esféricas presentes (20% de Au total) no fue excluido del cálculo y fue considerado como parte de los nanoprismas.

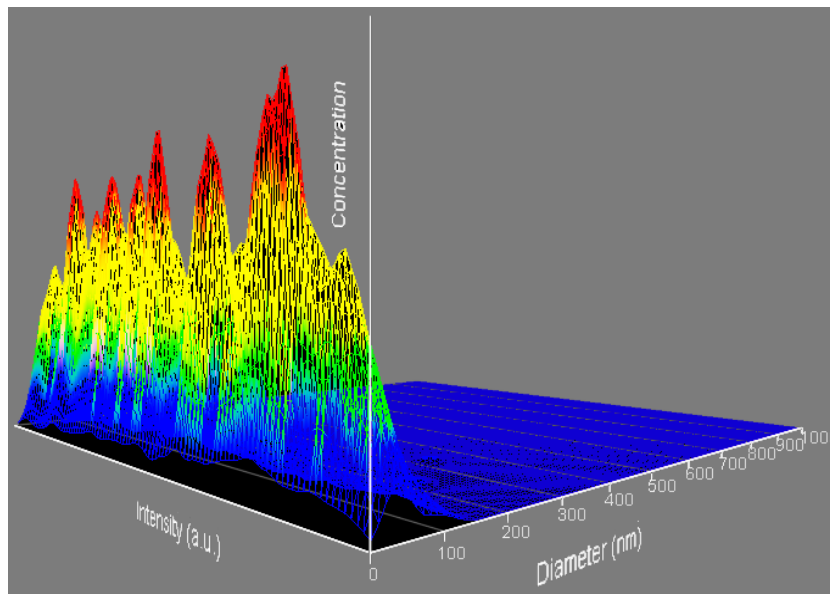
### **1.5.2. Determinación mediante análisis de seguimiento de nanopartículas**

Este método consiste en la medición directa de la concentración de NprO con el equipo NanosightNS3000, el cual permite, mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), visualizar partículas con tamaños entre los 20 a 2000 nm de forma directa y en tiempo real, entregando información

sobre número, tamaño e intensidad de difracción de la luz de las partículas analizadas en la muestra.

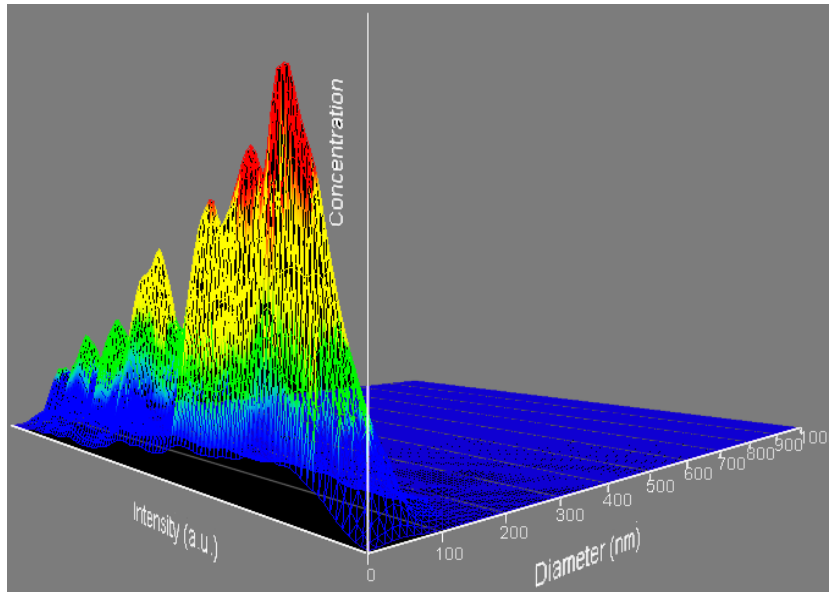
Se obtuvieron gráficos de concentración, intensidad y diámetro para las muestras NprO-PEGs (figura 38) y NprO-PEGs<sup>ENR</sup> (figura 39) a fin de corroborar diferencias entre muestras enriquecidas y sin modificar.

Los distintos picos observados dan cuenta de partículas de un mismo tamaño que pueden tener concentraciones e intensidades distintas entre sí por su morfología. Con estos datos se obtuvo un gráfico más uniforme para NprO-PEGs<sup>ENR</sup> respecto a NprO-PEGs, evidenciando menor polidispersidad para la muestra enriquecida, de igual forma que lo observado por DLS y por TEM.



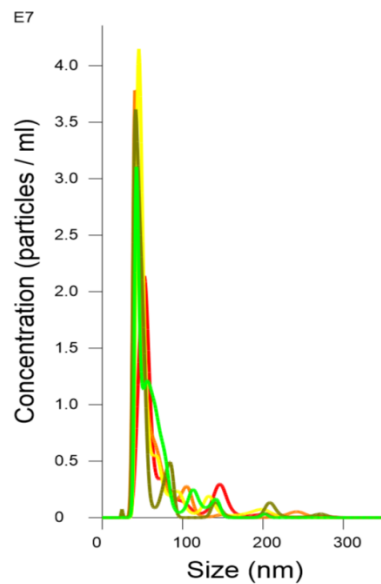
**Figura 38.** Gráfico NTA de NprO-PEGs. Gráfico de 3 dimensiones que posee ejes de intensidad (u.a.), diámetro (nm) y concentración. Muestras diluidas en relación 1/1000 en agua MILLI-Q.





**Figura 39.** Gráfico NTA de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. Gráfico de 3 dimensiones que posee ejes de intensidad (u.a.), diámetro (nm) y concentración. Muestras diluidas en relación 1/1000 en agua MILLI-Q.

Mediante este método se logró obtener que el tamaño promedio de la muestra NprO-PEGs<sup>ENR</sup> fue de  $66 \pm 2$  nm, la cual poseía una concentración de  $6,25 \times 10^8$  partículas por mililitro de solución (figura 40).



**Figura 40.** Gráfico de concentración de NprO-PEGs<sup>ENR</sup>. El número de partículas/mL y los tamaños (nm) de las poblaciones en 5 mediciones.

Con el valor de concentración (partículas/mL), utilizando el número de Avogadro ( $1 \text{ mol} = 6,022 \times 10^{23}$ ) y considerando la dilución 1:1000 de la muestra medida, se logró calcular la concentración original de los NprO-PEGs<sup>ENR</sup> que fue 1,04nM. Así, se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de la muestra NprO-PEGs<sup>ENR</sup> (tabla 2s de anexo), con las concentraciones conocidas se logró obtener una ecuación de la recta (figura 2s de anexo) cuya pendiente representa el coeficiente de extinción según la ley de Beer-Lambert. Obtenido el valor del coeficiente de extinción  $\epsilon = 6,6786$ , se calcularon los valores de la concentración de NprO en cualquier muestra según su absorbancia por UV-vis.

Para este trabajo se se utilizó el valor obtenido de coeficiente de extinción por NTA ya que el método por absorción atómica tiene una serie de posibles inconvenientes en su realización. La determinación por NTA es directa al solo necesitar de una dilución de la muestra a analizar y se obtiene un dato inmediato de concentración de partículas por mililitro. Además, este equipo no consideró las partículas esféricas de tamaños cercanos a 20 nm, realizando un conteo único de NprO presentes en la solución coloidal. Así es como se logró la determinación de las concentraciones utilizadas para los ensayos celulares en esta tesis.

## **2. Evaluar la estabilidad coloidal de nanoprismas de oro en medios de relevancia biológica**

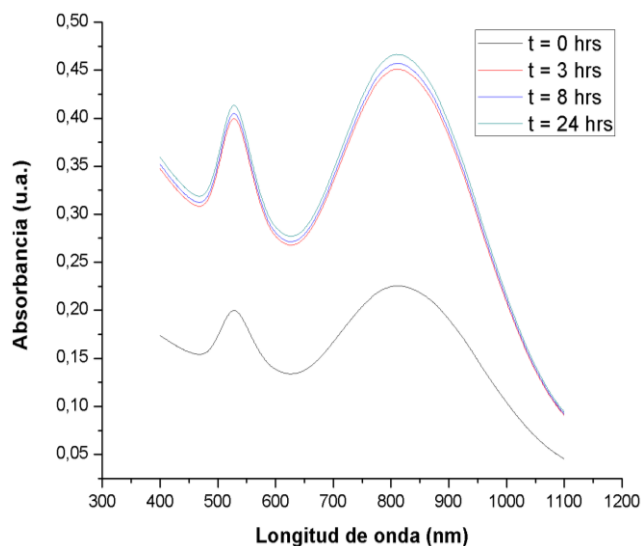
### **2.1. Estabilidad en medio de cultivo DMEM/F12**

Previamente a los ensayos celulares realizados, es necesario conocer la estabilidad coloidal de los nanosistemas disueltos en medio de cultivo celular DMEM/F12 1% SFB, ya que la presencia de la corona de proteínas podría afectar en los resultados de toxicidad celular si es que por ejemplo el sistema se desestabiliza y se agregaba en un precipitado insoluble.

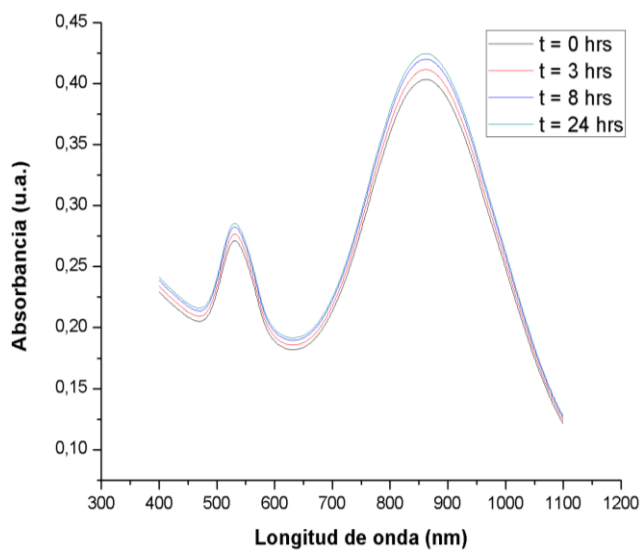
Con la finalidad de conocer los cambios que ocurren con los nanosistemas al estar disueltos en medio de cultivo celular DMEM/F12 1% y si la presencia de la corona de proteínas generaba algún efecto, es que se evaluó la estabilidad coloidal a 37°C, utilizando UV-vis, DLS y potencial zeta en diferentes periodos de incubación (0, 3, 8 y 24 horas) en un ensayo con n=3. Las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 se utilizaron a una concentración de 0,15 nM y diluida en el medio en una proporción 1:5, para una concentración final de 0,03 nM. Una vez concluido los tiempos de ensayo, las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en agua MILLI-Q para las mediciones posteriores.

Mediante los espectros obtenidos por espectroscopia UV-vis (figuras 41-43), se observó que los nanosistemas son estables al no variar la posición de su plasmón a los diferentes tiempos de estudio. Para NprO desnudos, se observó una disminución en la intensidad del máximo de absorbancia de prismas a tiempo 0, observándose también la formación de un precipitado que no pudo ser resuspendido en agua. Por su parte, la mantención de la posición del plasmón observada desde las 3 hasta 24 horas se explica por la presencia de la

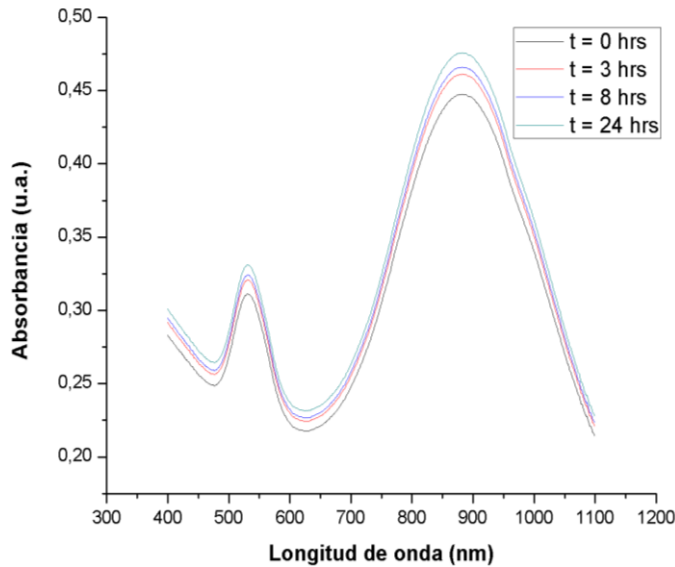
corona de proteínas que se forma en la superficie de los NprO [38, 39], otorgándoles estabilidad estérica frente a el proceso de centrifugación a los tiempos de estudio 3, 8 y 24 horas.



**Figura 41.** Espectro UV-vis de NprO en medio celular DMEM/F12 1%. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.

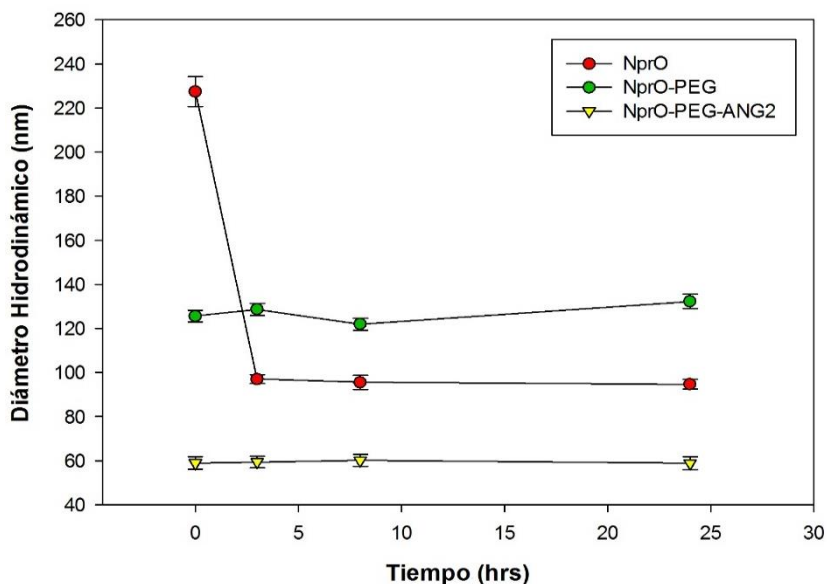


**Figura 42.** Espectro UV-vis de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> en medio celular DMEM/F12 1%. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.

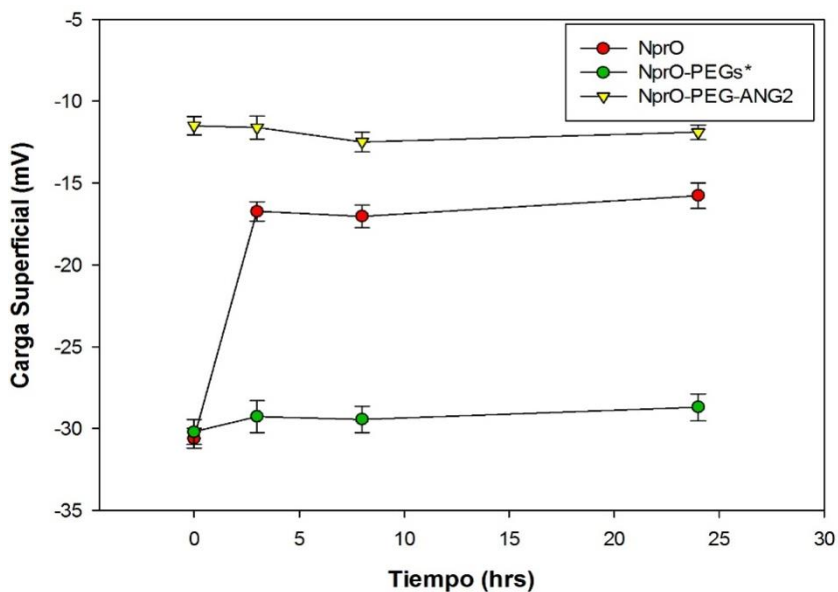


**Figura 43.** Espectro UV-vis de NprO-PEGs-ANG2 en medio celular DMEM/F12 1%. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.

La estabilidad coloidal de los distintos nanosistemas se evaluó también por DLS (figura 44) y potencial zeta (figura 45). Todas las muestras mostraron tamaños característicos para etapa de funcionalización, lo que da cuenta de la interacción de los nanosistemas con las moléculas presentes en el medio [38, 42], los cuales requieren estudios adicionales y el uso de otras técnicas para determinar y conocer la identidad de las proteínas presentes, donde no se puede descartar la posibilidad de agregados proteicos presentes en la medición. Sin embargo, es el hecho de no variar sus valores de diámetro hidrodinámico y carga superficial a las condiciones de estudio en los 3 ensayos realizados para cada muestra, que se demuestra la estabilidad de los nanosistemas, ya que estos parámetros cambian en los tiempos de estudio ante procesos de inestabilidad y agregación, corroborando así la información obtenida mediante espectroscopía UV-vis. Exceptuando de esta estabilidad a los NprO sin recubrimiento al tiempo inicial 0, que evidenciaron un mayor tamaño (230 nm) y una carga superficial de -31 mV, distinta a la obtenida desde las 3 horas (-16 mV), la cual se mantuvo constante hasta 24 horas al igual que su tamaño (90 nm).



**Figura 44.** Gráfico del diámetro hidrodinámico en medio celular DMEM/F12 1%. Estabilidad coloidal por DLS a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.



**Figura 45.** Gráfico de la carga superficial en medio celular DMEM/F12 1%. Estabilidad coloidal por potencial zeta a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n= 3.

Por lo cual, la modificación de la superficie de estas nanopartículas con las moléculas PEG y ANG2 provee al sistema de estabilidad coloidal para los ensayos biológicos y pensando en potenciales bioaplicaciones y/o terapias, se

evitarían las interacciones inespecíficas, aumentando el tiempo en circulación y la efectividad del tratamiento.

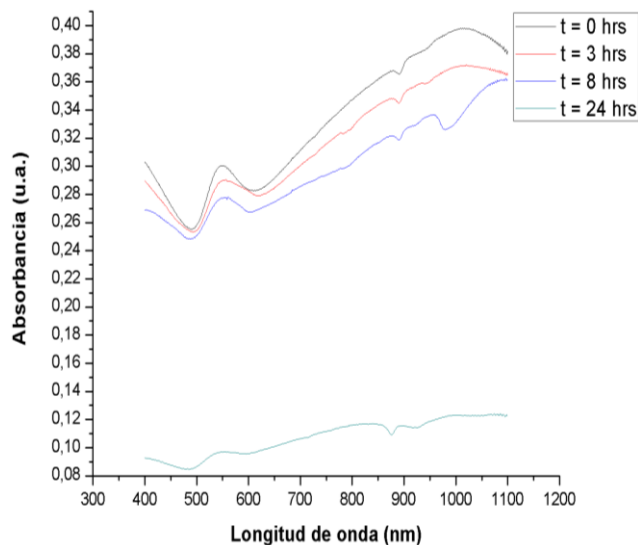
## **2.2. Estabilidad en tampón fosfato salino (PBS)**

Otro de los medios utilizados ampliamente en los ensayos celulares es el tampón fosfato salino. Se evaluó la estabilidad coloidal empleando diferentes técnicas como UV-vis-NIR, DLS y potencial zeta en 4 tiempos distintos (0, 3, 8 y 24 horas) en un ensayo con  $n=3$ , almacenadas a 37° C durante el estudio. Las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 se utilizaron a una concentración final de 0,03 nM. Una vez concluido los tiempos de ensayo, las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en agua MILLI-Q para las mediciones posteriores.

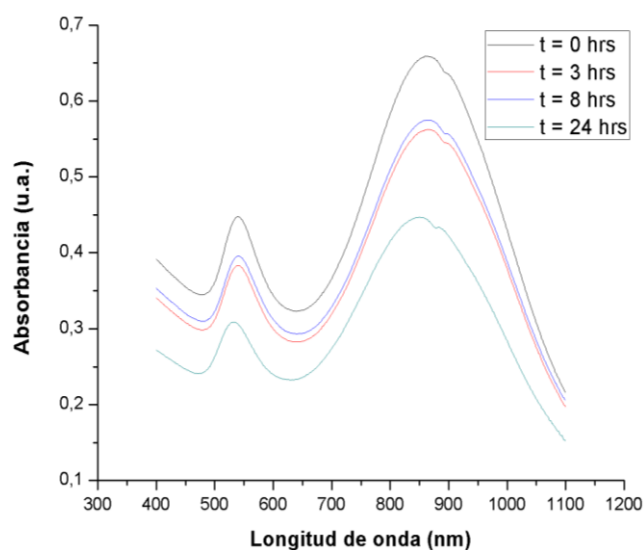
Mediante espectroscopía UV-vis se observó que los NprO desnudos presentan un ensanchamiento de la banda del plasmón de prismas, en conjunto con una disminución en el máximo de absorbancia, un desplazamiento en el espectro a 1.030 nm con respecto a los NprO en agua (810 nm), y una pérdida del plasmón a 24 horas (figura 46). Además, se observó una decoloración de la solución al y la formación de un precipitado insoluble. Esto da cuenta de una agregación para los NprO y se condice con lo reportado en la literatura respecto a la acción desestabilizante de la fuerza iónica presente en PBS sobre las NPO en general, donde la estabilidad se mide por dos características: (1) autoagregación entre las partículas del medio y (2) la desaparición de partículas cuando se adhieren a las superficies del sustrato circundante, como vidrio, metal o polímeros [112].

Para los NprO-PEGs<sup>ENR</sup> (figura 47) y NprO-PEGs-ANG2 (figura 48) se observó que las muestras permanecen estables, sin cambios en amplitud ni

posición de sus plasmones, sin embargo, la intensidad del máximo de absorbancia disminuyó en los tiempos de 3, 8 y 24 horas, indicando pérdida parcial de la muestra, que se evidenció en el tubo de centrifuga, ya que parte de la muestra quedó adherida en su pared.

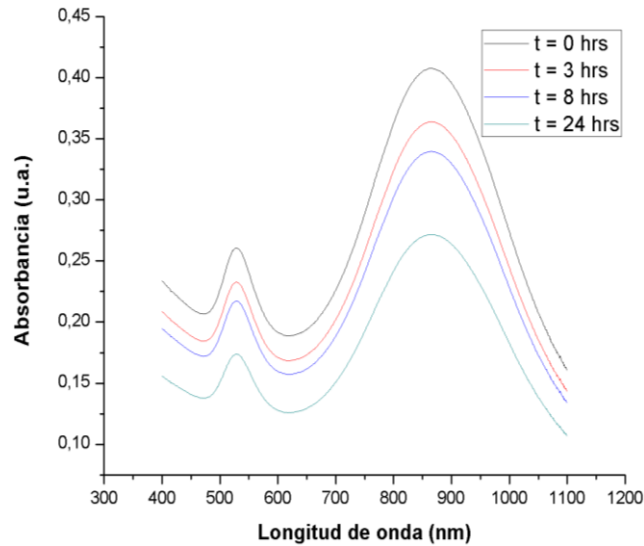


**Figura 46.** Espectro UV-vis de NprO en PBS. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.



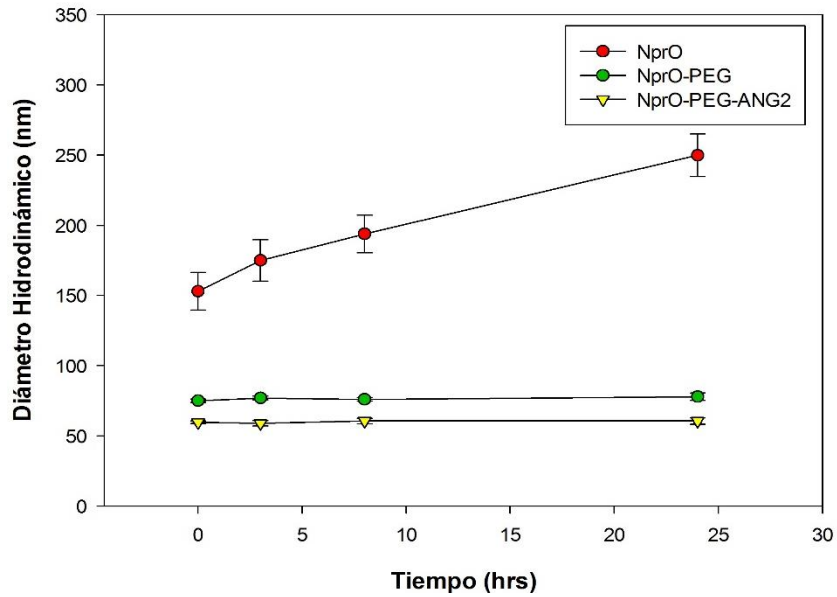
**Figura 47.** Espectro UV-vis de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> en PBS. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 y almacenadas a 37° C. n=3.



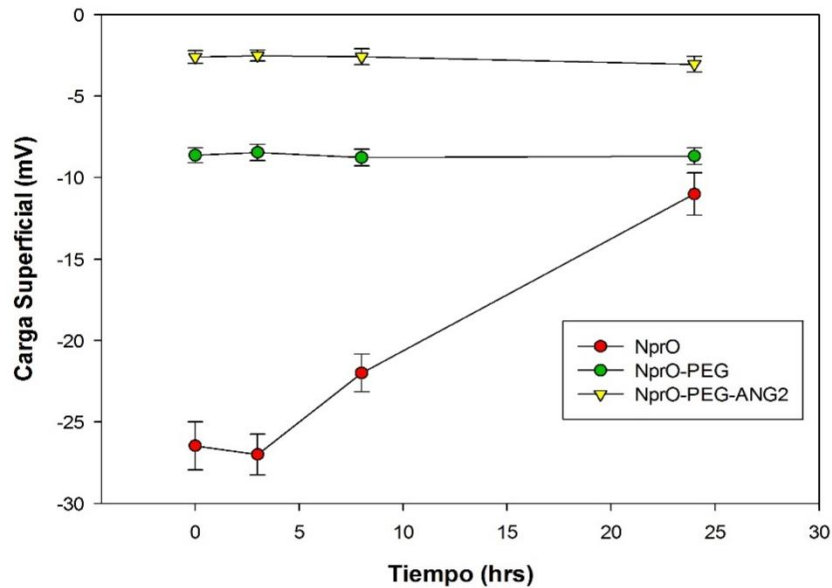


**Figura 48.** Espectro UV-vis de NprO-PEGs-ANG2 en PBS. Evaluación de la estabilidad coloidal a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenadas a 37° C. n=3.

Además, la estabilidad coloidal se estudió usando DLS (figura 49) y potencial zeta (figura 50). Se obtuvo que las muestras NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 al ser sometidas a un aumento en la fuerza iónica con PBS, no variaron su diámetro hidrodinámico y carga superficial en los tiempos de estudio, evidenciando en los 3 ensayos realizados, la estabilidad de estos nanosistemas ya observada por UV-vis. Sin embargo, para el caso de los NprO sin recubrimiento se evidenció un tamaño y una carga superficial que fue en aumento en los tiempos de estudio, corroborando la agregación total de los NprO en PBS y la presencia de agregados insolubles, de igual forma que por UV-vis.



**Figura 49.** Gráfico del diámetro hidrodinámico en PBS. Estabilidad coloidal por DLS a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenamiento a 37° C. n=3.



**Figura 50.** Gráfico de la carga superficial en PBS. Estabilidad coloidal por DLS a 0, 3, 8 y 24 hrs. Muestras a 0,03 nM y almacenamiento a 37° C. n=3.

Los datos obtenidos por DLS y potencial zeta dieron cuenta de que los nanosistemas en solución son estables para el caso de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 al no variar su diámetro hidrodinámico ni su carga superficial en

los tiempos de estudio. Para los NprO, se observó que tanto su diámetro como carga varió a lo largo de los distintos tiempos medidos, indicando la agregación parcial del sistema desde un principio hasta la agregación total a las 24 horas.

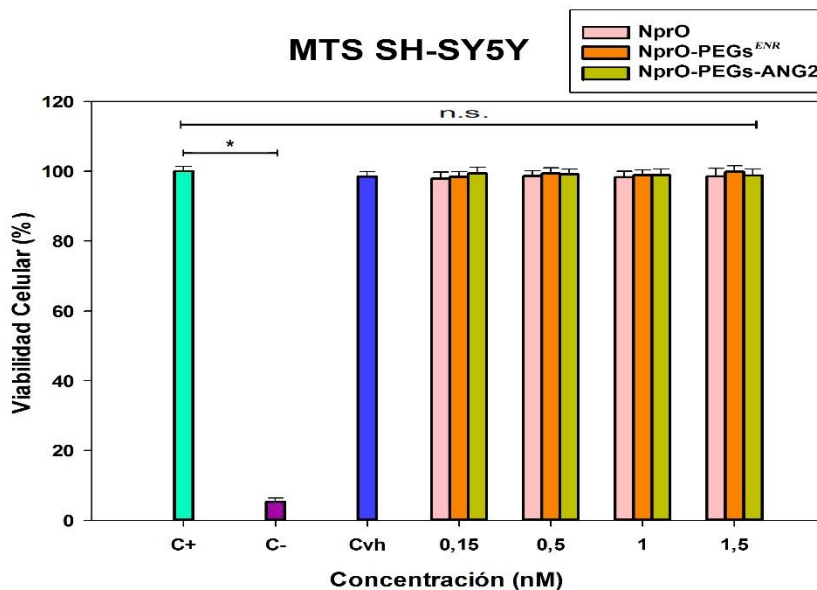
Estos datos en conjunto comprueban que el recubrimiento de los NprO con moléculas de PEGs y ANG2 otorgan estabilidad al nanosistema, sin riesgo de agregación para los ensayos celulares. Los NprO a pesar de no tener recubrimiento pueden ser estabilizados por la CP presente en el medio DMEM/F12 1%, pero no en PBS ya que estos fueron desestabilizados y al no existir proteínas en el medio no se formó la corona de proteína.

### **3. Evaluar la citotoxicidad del nanosistema NprO-PEGs-ANG2 en la línea celular SH-SY5Y**

#### **3.1. Ensayo de viabilidad celular MTS**

Utilizando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual se utiliza como un modelo celular tipo neuronal, se determinó si los nanosistemas NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 tienen algún efecto sobre la viabilidad celular. Este ensayo consiste en corroborar la viabilidad celular a través de la actividad mitocondrial, la cual reduce la sal MTS y produce un compuesto coloreado (formazán) [113]. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad para las muestras en concentraciones crecientes desde 0,15 a 1,5 nM, siendo estas concentraciones adecuadas y estudiadas comúnmente para aplicación en efectos fototérmicos *in vitro* e *in vivo* de estos nanomateriales [32, 33], con 24 horas de exposición (figura 51). Además, se realizó este ensayo a las mismas

concentraciones, pero con tiempo de exposición de 48 y 72 horas (figura 3s y 4s anexo, respectivamente).



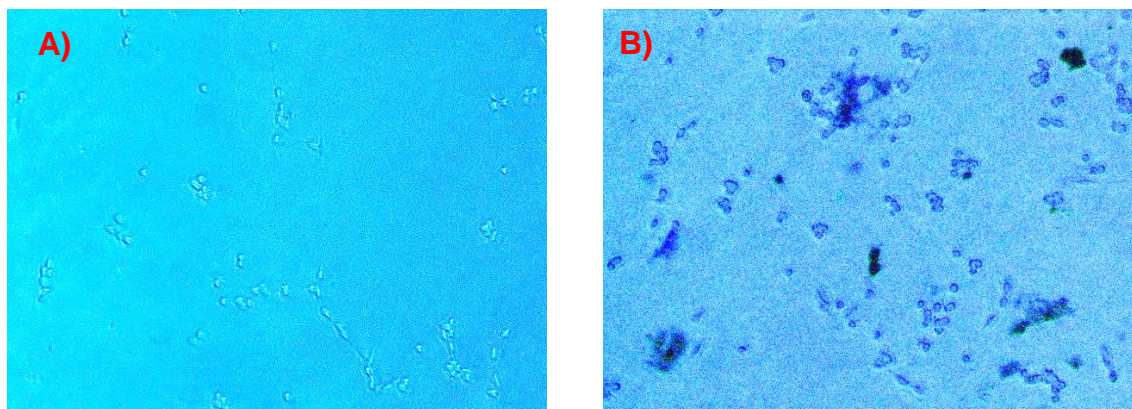
**Figura 51.** Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS. C+ (medio), C- (SDS), Cvh (agua) y los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 24 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.

El ensayo MTS evalúa la actividad mitocondrial, la que se relaciona directamente con la viabilidad celular, pero si los compuestos analizados afectan esta función, ya sea aumentándola o disminuyéndola, pueden afectar la interpretación de los resultados.

El análisis de la viabilidad celular por este ensayo muestra que los nanosistemas NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 no presentan efectos en citotóxicos en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y en las condiciones ensayadas. Lo anterior debido a que no existen diferencias significativas entre el control positivo y las muestras estudiadas, existiendo diferencia significativa solo con el control de muerte celular (SDS).

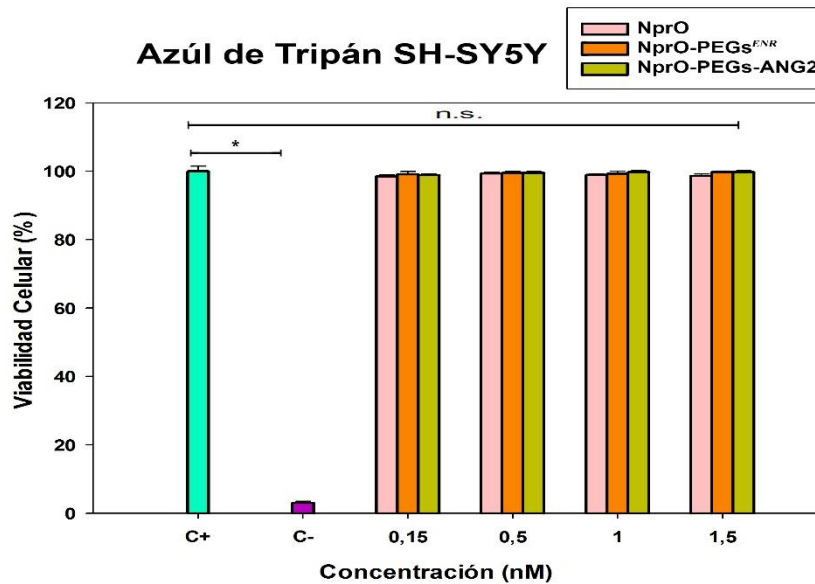
### 3.2. Ensayo azul de tripán (TPB)

Mediante el ensayo azul de tripán (TPB) se realizó un conteo de células vivas y células muertas [114]. El agente de tinción TPB se utiliza en ensayos de viabilidad celular por su capacidad de diferenciar células vivas de muertas. Las células vivas o tejidos con su membrana celular intacta no se colorean debido a la selectividad que esta posee, impidiendo su entrada. Por el contrario, la membrana celular en las células muertas suele estar comprometida y con poros que permiten la entrada del TPB y muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio (figura 52).



**Figura 52.** Tinción por azul de tripán en SH-SY5Y. **A)** Células vivas (transparentes) en contacto con el colorante TPB. **B)** Células vivas (transparentes) y muertas (azules) en contacto con el colorante TPB.

Mediante el conteo celular en la cámara de Neubauer al microscopio, se obtuvo el porcentaje de viabilidad de NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 en concentraciones de 0,15 a 1,5 nM con exposición por 24 horas (figura 53).



**Figura 53.** Gráfico viabilidad celular por azul de tripán. C+ (medio), C- (SDS), los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 24 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.

Además, se realizó este ensayo a las mismas concentraciones, con un tiempo de exposición de 48 y 72 horas con los tratamientos (figura 5s y 6s del anexo, respectivamente).

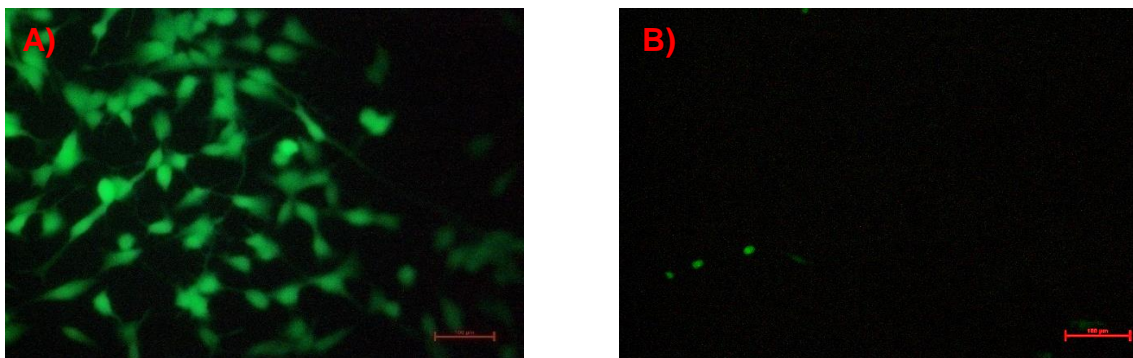
El ensayo por azul de tripán mostró que la viabilidad celular nunca descendió del 99% para todas las muestras ensayadas. Además, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales comparado con el control positivo, solo con el control negativo. Por lo que mediante este ensayo no se observaron efectos sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y a las condiciones estudiadas.

Una potencial desventaja de este ensayo es que el TPB en sí es un agente que puede ser tóxico si se deja por un tiempo prolongado con las células, por lo que los valores obtenidos fueron de manera inmediata a la mezcla con TPB y de

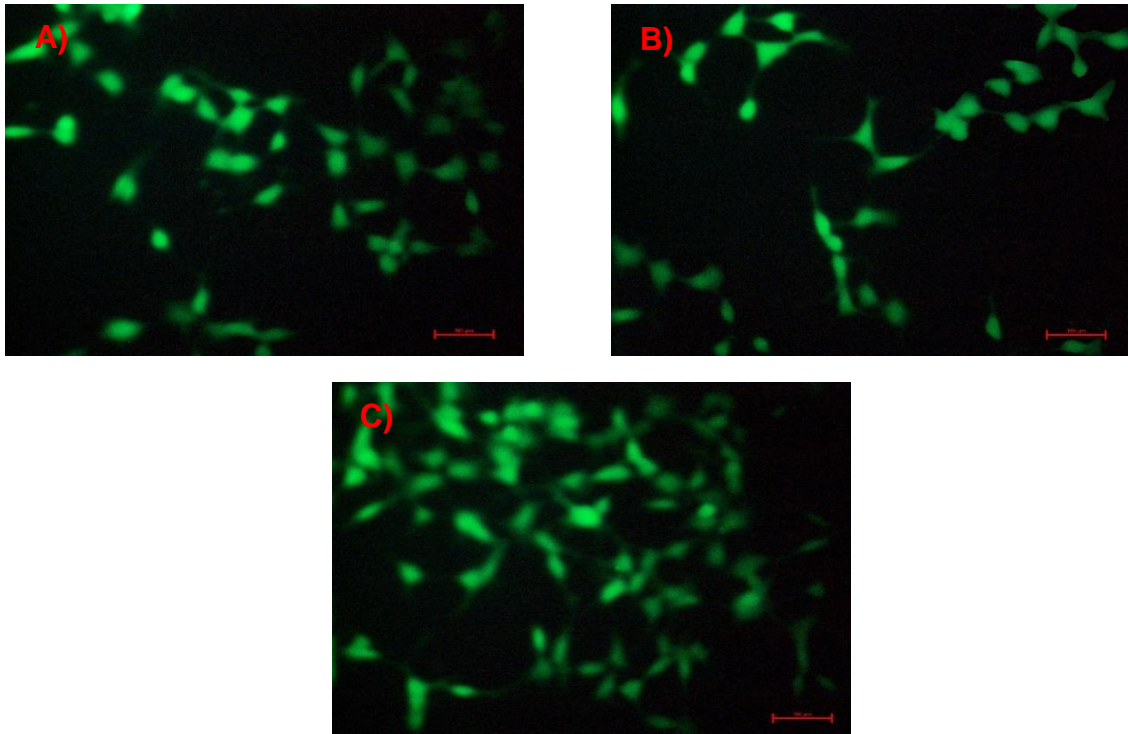
manera secuencial, es decir se tiñó un pocillo a la vez previo a su observación al microscopio.

### 3.3. Imagenología y Fluorescencia por Calceína

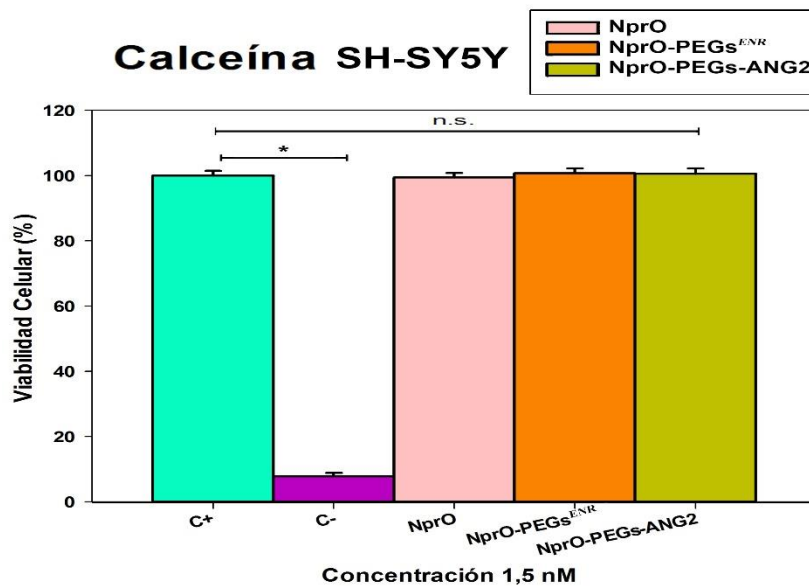
Mediante el uso del fluoróforo verde calceína(CALC) se evaluó la viabilidad celular de la línea celular SH-SY5Y. Esta molécula viene modificada con un grupo éster acetoximetilado que le permite el traspaso a través de la membrana plasmática, recibiendo el nombre de calceína-AM (CALC-AM), el cual no es fluorescente. Una vez que CALC-AM es absorbida por las células vivas, la actividad de enzimas esterases escinde el grupo éster de CALC-AM a CALC, la cual es fuertemente fluorescente y dejando secuestrado el fluoróforo en el citoplasma [115]. Se obtuvieron imágenes por microscopía de los controles (figura 54) y las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 (figura 55) a una concentración de 1,5 nM fueron incubadas 24 horas con las células. Además, se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular por intensidad de fluorescencia (figura 56).



**Figura 54.** Imágenes por Microscopía con fluorescencia verde para C+ y C-. **A)** C+ Control positivo (medio), se observa la población de células vivas teñidas de verde por incorporar el fluoróforo CALC. **B)** C- Control negativo (SDS 0,1%), baja población teñida. Exposición de 24 hrs en células SH-SY5Y. Ajuste a 100  $\mu$ m.



**Figura 55.** Imágenes por Microscopía con fluorescencia verde para NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2. **A)** Células con NprO 1,5 nM, **B)** Células con NprO-PEGs<sup>ENR</sup> 1,5 nM y **C)** Células con NprO-PEGs-ANG2 1,5 nM. Exposición de 24 hrs en células SH-SY5Y. Ajuste de 100  $\mu$ m.



**Figura 56.** Gráfico viabilidad celular por intensidad de fluorescencia. C+ control positivo (medio), C- control negativo (SDS 0,1%). Las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 se incubaron por 24 hrs en células SH-SY5Y a una concentración de 1,5 nM. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.

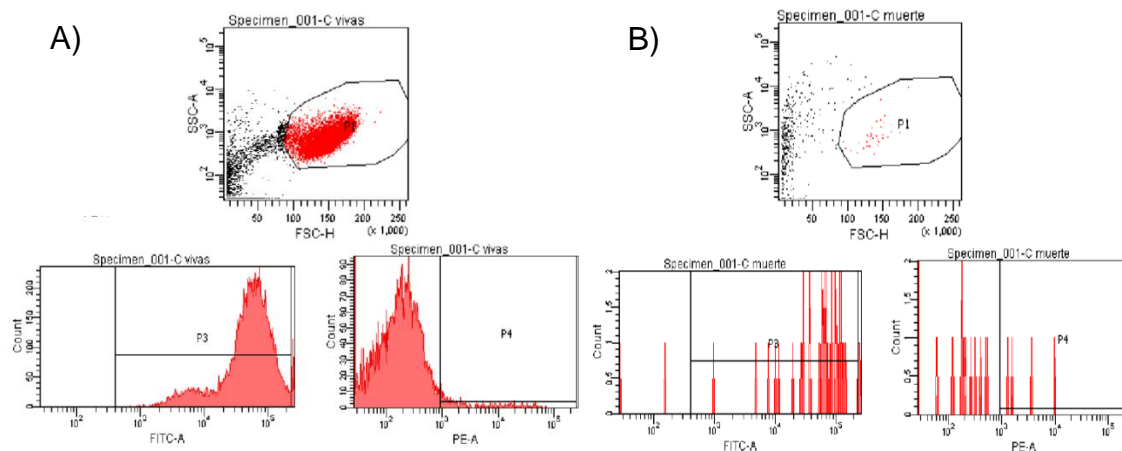


El inconveniente que este ensayo presenta es que al ser un marcador solo de células vivas, no da cuenta real de las células muertas presentes.

Mediante la utilización del fluoróforo calceína se logró la tinción de las células vivas para así determinar el porcentaje de viabilidad celular por la intensidad de fluorescencia al interior de las células. Los datos obtenidos mostraron que los nanosistemas no presentaron efectos sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y a las condiciones estudiadas.

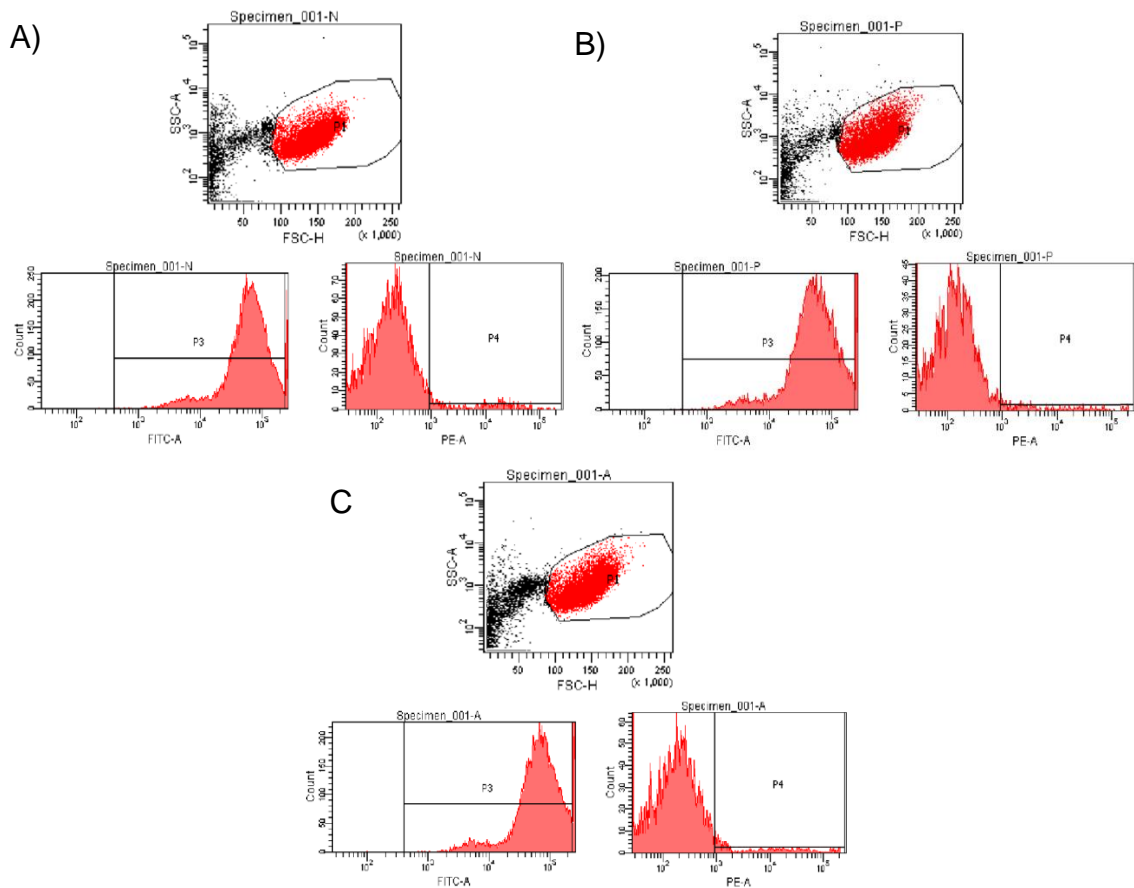
### **3.4. Citometría de flujo**

Como último ensayo celular en esta tesis se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo, cuya técnica se basa en la utilización de luz láser para el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas [116] y en conjunto con el uso del kit *LIVE/DEAD* se pudo diferenciar células vivas de muertas por fluorescencia. Este *kit* para ensayos de viabilidad consta de 2 fluoróforos que son calceína-AM ( $515_{em}/488_{ex}$ ) para el marcaje de células vivas y homodímero de Etidio ( $602_{em}/570_{ex}$ ), que es un fluorescente débil hasta que se une al ADN de células muertas cuya membrana no está intacta. De este modo, se obtuvieron gráficos de citometría para los controles positivo y negativo utilizados (figura 57) y para los tratamientos con NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup>, NprO-PEGs-ANG2 a una concentración de 1,5 nM durante 24 horas (figura 58).



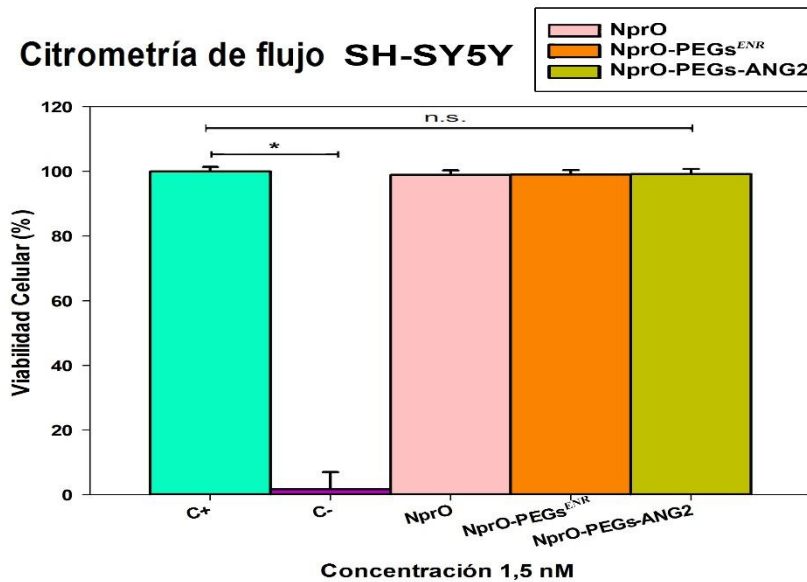
**Figura 57.** Gráficos de las poblaciones en los controles C+ y C-. **A)** control positivo (medio) donde se muestra la población considerada con 10.000 eventos (P1), la población de células vivas (P3) con filtro FITC-A y la población de células muertas (P4) con filtro PE-A. **B)** control negativo (SDS 0,01 %) con las poblaciones P1 considerada con 36 eventos, P3 y P4. Filtro FITC-A para marcador verde (CALC) y PE-A para marcador rojo (HdE).

El ensayo fue validado al comprobar que los controles positivo y negativo pudieron diferenciar las poblaciones vivas de muertas gracias a los marcadores CALC y HdE. Por su parte el control positivo consideró 10.000 eventos (células) para el cálculo de porcentaje de viabilidad y el control negativo solo consideró 36 eventos, que se atribuye a la muerte celular ocurrida a las 24 horas con SDS 0,01%. Las poblaciones que aparecen en color negro en P1 de ambos controles son restos celulares que no fueron considerados como eventos y que son inherentes a cada medición realizada, por pérdida de un pequeño porcentaje de la población total en la preparación de la muestra.



**Figura 58.** Gráficos de las poblaciones en los tratamientos. **A)** tratamiento NprO donde se muestra la población P1 considerada con 10.000 eventos, la población de células vivas P3 con filtro FITC-A y la población de células muertas P4 con filtro PE-A. **B)** tratamiento NprO-PEGs<sup>ENR</sup> con las poblaciones P1 considerada con 10.000 eventos, P3 y P4. **C)** tratamiento NprO-PEGs-ANG2 con las poblaciones P1 considerada con 10.000 eventos, P3 y P4. Filtro FITC-A para marcador verde (CALC) y PE-A para marcador rojo (HdE).

Además, se calculó el porcentaje de viabilidad celular para de cada uno a las condiciones ensayadas considerando los eventos obtenidos para cada muestra analizada (figura 59).



**Figura 59.** Gráfico viabilidad celular por citometría de flujo. C+ control positivo (medio), C- control negativo (SDS 0,1%). Las muestras NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 tuvieron un tiempo de 24 hrs en células SH-SY5Y a una concentración de 0,5 nM. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.

La potencial desventaja que este ensayo podría presentar es en la preparación de las células para ser analizadas en el citómetro, ya que estas podrían ser mal manipuladas (centrifugación y resuspensión de células), siendo dañadas y eventualmente destruidas previo a su análisis.

Mediante la utilización del kit *LIVE/DEAD* se logró la tinción de células vivas y muertas y determinar el porcentaje de viabilidad celular por citometría de flujo. Los datos obtenidos mostraron que los nanosistemas no presentaron efectos sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y a las condiciones estudiadas. Corroborado ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales comparado con el control positivo, solo con el control negativo.

Finalmente, los resultados obtenidos mediante estos 4 ensayos celulares realizados demostraron que los nanosistemas NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2 en concentraciones crecientes (0,15, 0,5, 1,0 y 1,5 nM) durante una incubación de 24 horas con las células SH-SY5Y no presentaron efectos sobre la viabilidad celular.

Estos nuevos resultados obtenidos se condicen con estudios anteriores realizados para NprO estudiados en líneas de cáncer gástrico [32] y células epiteliales de riñón de mono [35]. Además de otras estructuras anisotrópicas como las nanovarillas oro en células de neuroblastoma humano [74].

## Capítulo IV

### Conclusiones y proyecciones

Los fines de esta investigación fueron evaluar la estabilidad coloidal de NprO con y sin modificaciones a su superficie, a través de la funcionalización con PEGs tiolados y angiopep-2, usando técnicas de caracterización fisicoquímica. A su vez, estudiar el comportamiento de estos nuevos nanosistemas en medios de cultivo celular, y los efectos que estos podrían tener sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y.

NprO fueron obtenidos de manera reproducible y con alto control de la concentración y tamaño de partícula. El máximo de absorbancia se ubicó en la zona del infrarrojo cercano, entre 800 y 900nm. Además, que los NprO evaluados durante 30 días, permanecen estables a temperatura ambiente. Los

cambios fisicoquímicos en el nanosistema en las distintas etapas de conjugación y funcionalización dan cuenta del éxito en las metodologías utilizadas en la incorporación de las moléculas de interés PEG y ANG2. Estas modificaciones superficiales fueron corroboradas mediante cambios en el diámetro hidrodinámico y carga superficial de los nanosistemas. Además, se caracterizaron usando espectroscopia UV-vis para a su vez, chequear la permanencia de las bandas de absorción. Todos los sistemas obtenidos en cada etapa de funcionalización se visualizaron usando microscopía electrónica de transmisión y barrido, mostrando los tamaños obtenidos y su morfología característica.

Se logró enriquecer el sistema aplicando un protocolo de centrifugaciones, reduciendo el número de esferas producidas como subproducto de la reacción y logrando así el enriquecimiento de nanoprismas de un 92% a 96%. Adicionalmente, se demostró la estabilidad coloidal de los NprO en sus distintos grados de multifuncionalización, en DMEM/F12 1%. Para el caso de los estudios realizados en PBS, se observó que los NprO sin recubrimiento son completamente inestables, sin embargo, cuando son funcionalizados con PEG y con PEG-ANG2, los nanoprismas son estables en el tiempo de estudio hasta 24 horas, pero con un porcentaje de la población adherida al tubo de centrífuga durante el ensayo desde las 3 horas.

Finalmente, estos nanosistemas no presentaron efectos sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y en concentraciones desde 0,15 a 1,5 nM con una exposición de 24 horas, mediante las 4 técnicas de viabilidad utilizadas en este proyecto. Estos resultados contribuyen a la primera aproximación de la toxicidad de los NprO pensando en terapias para enfermedades neuronales

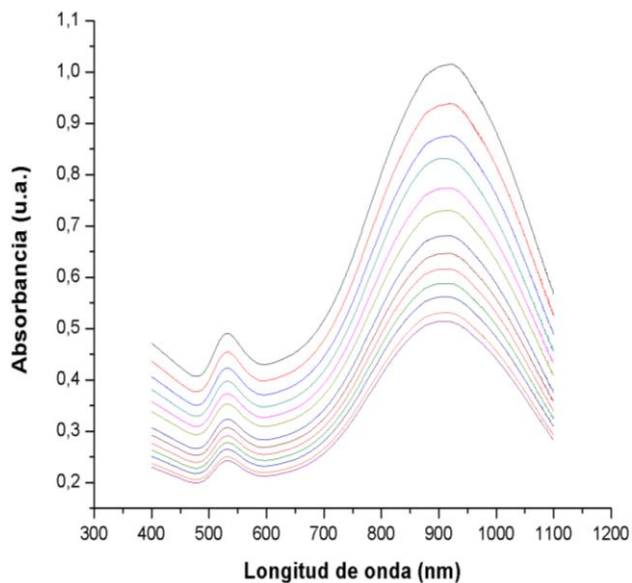
como el Alzheimer, haciendo a estas nanopartículas un potencial candidato para su utilización.

Para aumentar la información y contribuir aún más sobre estos nanoprismas de oro en este mismo contexto, es que el trabajo posterior y las proyecciones que tiene este trabajo de tesis son los siguientes:

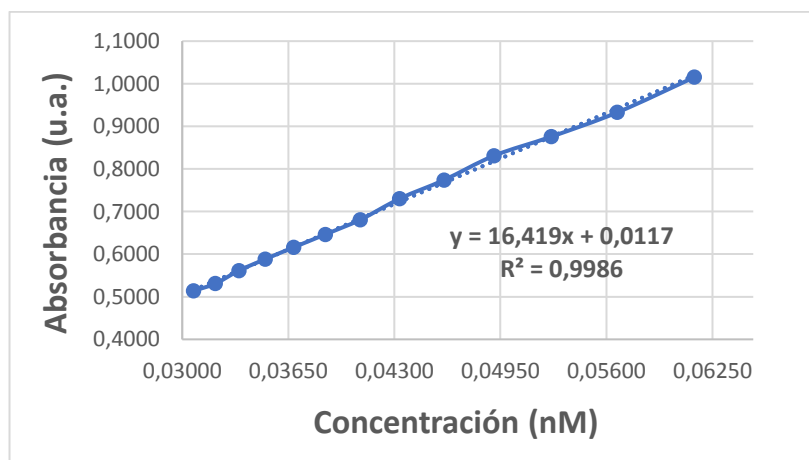
- Multifuncionalizar el nanosistema con péptidos que le otorguen direccionamiento a los agregados A $\beta$  considerando una terapia para Alzheimer. (En desarrollo)
- Evaluar la capacidad de penetración celular en líneas de barrera hematoencefálica como las células endoteliales bEnd.3 y conocer su toxicidad.
- Evaluar la toxicidad *in vivo* de los NprO para justificar su uso en terapia.
- Conocer la biodistribución de los NprO al ser administrados en un modelo animal y ver el porcentaje de llegada a su blanco.
- Estudiar sus usos en diagnóstico y terapia fototérmica para desagregar agregados tóxicos del péptido  $\beta$ -amiloide.

## Anexos

Concentración (nM)	Absorbancia (u.a.)
0,061	1,015
0,057	0,933
0,053	0,876
0,049	0,831
0,046	0,774
0,043	0,731
0,041	0,681
0,039	0,646
0,037	0,616
0,035	0,588
0,033	0,565
0,032	0,531
0,031	0,532



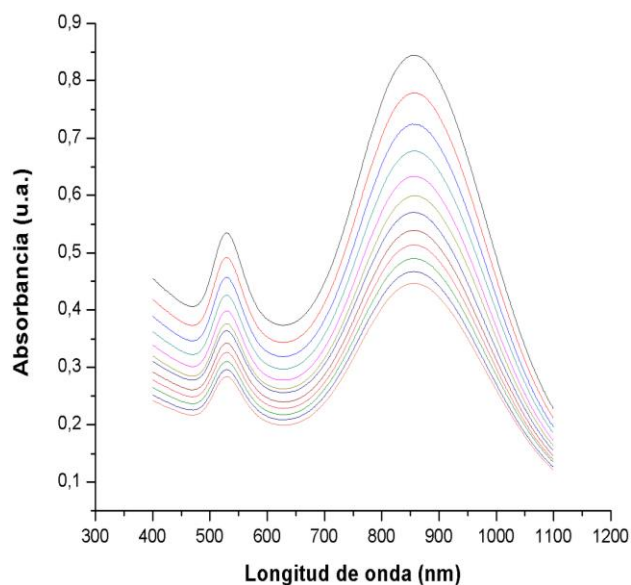
**Tabla 1s.** Datos curva de calibración por absorción atómica. Serie de datos utilizados para la curva de calibración de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y ecuación de la recta.



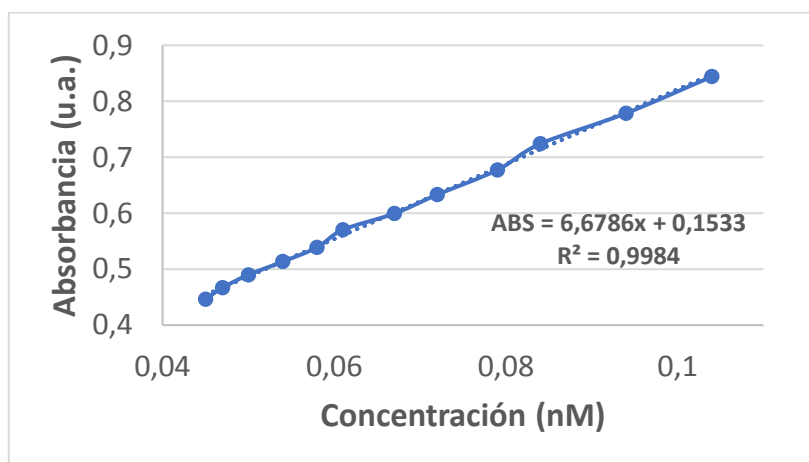
**Figura 1s.** Gráfica de la curva de calibración de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> por absorción atómica. Curva realizada con los datos de la tabla 4, con un  $R^2$  de 0,9984, pendiente ( $\epsilon$ ) de 16,419e intercepto de 0,0117.



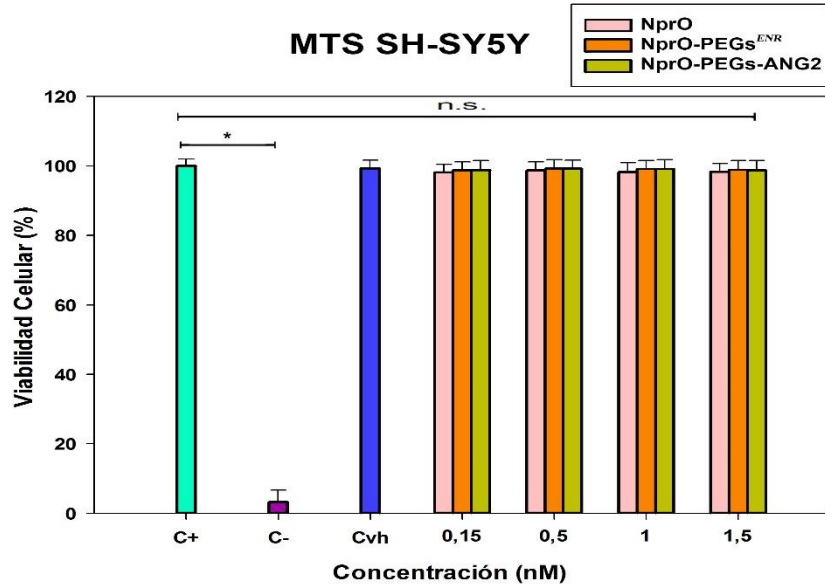
Concentración (nM)	Absorbancia (u.a.)
0,104	0,844
0,094	0,779
0,084	0,724
0,079	0,677
0,072	0,633
0,067	0,599
0,061	0,570
0,058	0,539
0,054	0,513
0,050	0,490
0,047	0,467
0,045	0,446



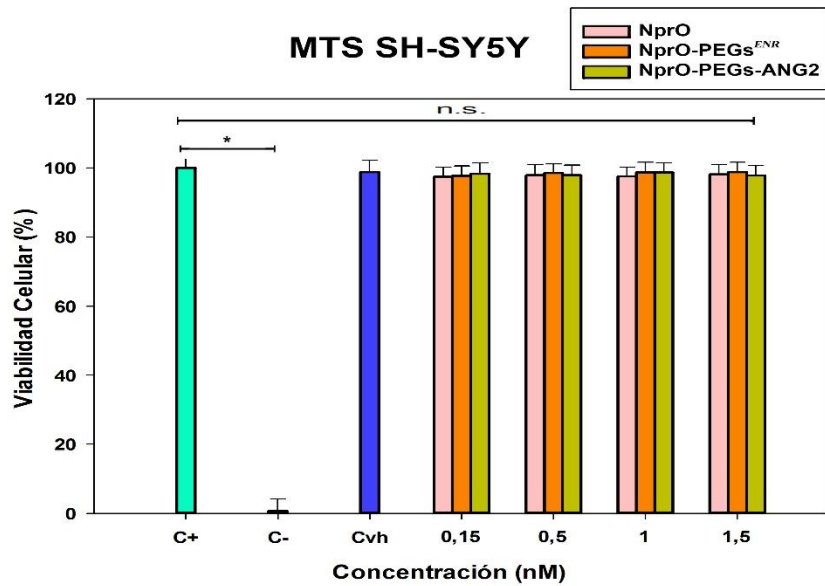
**Tabla 2s.** Datos curva de calibración por NTA. Serie de datos utilizados para la curva de calibración de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y ecuación de la recta.



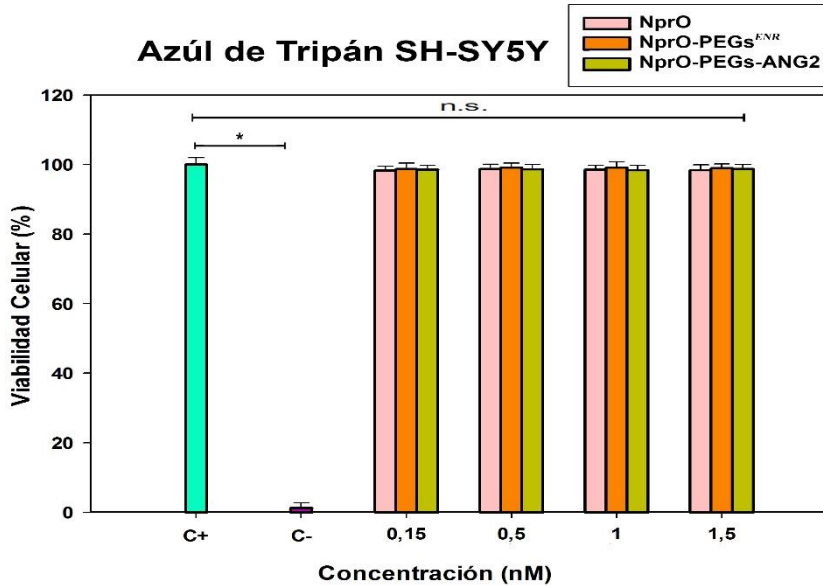
**Figura 2s.** Gráfica de la curva de calibración de NprO-PEGs<sup>ENR</sup> por NTA. Curva realizada con los datos de la tabla 4, con un  $R^2$  de 0,9984, pendiente ( $\epsilon$ ) de 6,6786 e intercepto de 0,1533.



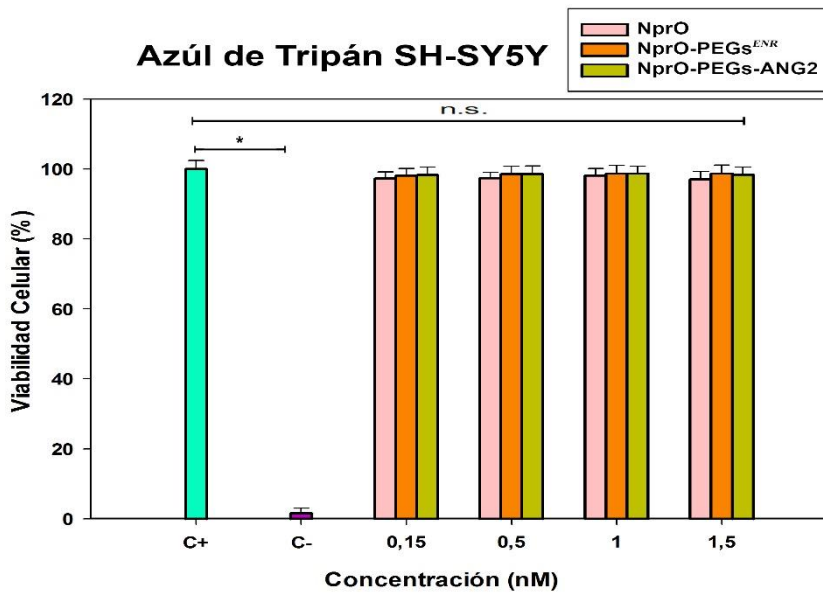
**Figura 3s.** Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS. C+ (medio), C- (SDS), Cvh (agua) y los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 48 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.



**Figura 4s.** Gráfico viabilidad celular por ensayo MTS. C+ (medio), C- (SDS), Cvh (agua) y los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 72 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.



**Figura 5s.** Gráfico viabilidad celular por azul de tripán. C+ (medio), C- (SDS), los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 48 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak



**Figura 6s.** Gráfico viabilidad celular por azul de tripán. C+ (medio), C- (SDS), los tratamientos corresponden a NprO, NprO-PEGs<sup>ENR</sup> y NprO-PEGs-ANG2, a concentraciones de 0,15, 0,5, 1 y 1,5 nM por 72 horas en células SH-SY5Y. Los experimentos fueron realizados en triplicado con un n = 3. \* P < 0,05, Holm-Sidak.

## Bibliografía

1. Fischer, H. et al., Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol.* 2007; 18: p. 565-571.
2. Ghosh, P., et al., Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60: p. 1307-1315.
3. El-Sayed, I. et al., Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett.* 2005; 5: p. 829-834.
4. Yguerabide, J. et al., Resonance light scattering particles as ultrasensitive labels for detection of analytes in a wide range of applications. *J. Cell Biochem.* 2001; 84: p. 71-81.
5. Karhanek, M. et al., Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Lett.* 2005; 5: p. 403-407.
6. Taton, T. et al., Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *Am. Chem. Soc.* 2001; 123: p. 5164-5165.
7. Kohler, N. et al., Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir.* 2005; 21: p. 8858-8864.
8. Yang, P. et al., Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjugate Chem.* 2005; 16: p. 494-496.
9. Hirsch, L. et al., Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: p. 13549-13554.
10. Bergen JM. et al., Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol Biosci.* 2006; 6: p. 506-516.
11. Iyer, AK. et al., Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* 2006; 11: p. 812-818
12. Kogan, M. et al., Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine Lond.* 2014; 9: p. 2023-2039.
13. Gobin, A. et al., Near-infrared resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small.* 2010; 6: p. 745-752.
14. Kogan, M. et al., Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine Lond.* 2014; 13: p. 2023-2039.
15. El-Sayed, M. et al., Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Acc Chem Res.* 2001; 34: p. 257-264.
16. DeNardo, G. et al., Concepts, consequences, and implications of theranosis. *Seminars in Nuclear Medicine.* 2012; 3: p. 147-150.
17. Huang, X et al., Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: a potential cancer diagnostic marker. *Nano Lett.* 2007; 7: p. 1591-1597.
18. Huang, X et al., Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. *Nanomedicine.* 2007; 2: p. 681-693.
19. Cole, L, et al., Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine (Lond).* 2015; 10: p. 321-341.

20. Poornima, K. et al., Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *PNAS* 2013; 110: p. 10753-10758.
21. Cui, B. et al., Fabrication of large area nanoprism arrays and their application for surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanotechnology*. 2008; 19: p. 145302
22. Chu, L. et al., Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 2012; 18: p. 228-37.
23. Arvizo, R. et al., Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010; 7: p. 753–763.
24. Millstone, J. et al., Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small* 2009; 6: p. 646–64.
25. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: p. 316-317.
26. Huang, X. et al., Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorod. *Journal of the American Chemical Society*. 2006; 128: p. 2115–2120.
27. Weissleder, R et al., Clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: p. 316-317.
28. Ah, CS. et al., Chem Mater. Size-controlled synthesis of machinable single crystalline gold nanoplates. *Chemistry of Materials*. 2005; 17: p. 5558–5561.
29. Millstone, J. et al., Observation of a quadrupole plasmon mode for a colloidal solution of gold nanoprisms. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127: p. 5312-5313.
30. Yang, X. et al., Silver/gold core-shell nanoprism-based plasmonic nanoprobe for highly sensitive and selective detection of hydrogen sulfide. *Chemistry*. 2015; 21: p. 988-992
31. You, Y. et al., Silica-coated triangular gold nanoprisms as distance-dependent plasmon-enhanced fluorescence-based probes for biochemical applications. *Nanoscale*. 2016; 8: p. 18150-18160
32. Daxiang, C. Gold nanoprisms as a hybrid in vivo cancer theranostic platform for in situ photoacoustic imaging, angiography, and localized hyperthermia. *Nano Res*. 2016; 9: p. 1043
33. Shouju, W. et al., PEGylated Gold Nanoprisms for Photothermal Therapy at Low Laser Power Density. *RSC Advances*. 2015; 99: p. 81.682.
34. Jethava, D. et al., Acute cyanide Intoxication: A rare case of survival. *Indian Journal of Anaesthesia*. 2014; 58: p. 312–314.
35. Pelaz, B. et al., Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir*. 2012; 28: p. 8965-8970.
36. Ambrosone, A et al., Gold nanoprisms for photothermal cell ablation in vivo. *Nanomedicine* 2014; 9: p. 1913–1922.
37. Bao, C et al., Gold nanoprisms as optoacoustic signal nanoamplifiers for in vivo bioimaging of gastrointestinal cancers. *Small* 2013; 9: p. 68–74.
38. Li, S. et al., Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008; 5: p. 496-504.
39. Olmedo, I. et al., How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH<sub>2</sub> can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils. *Bioconjug Chem*. 2008; 19: p. 1154-1163.

40. Wang, Y. et al., Comparison of anionic and lewis acid stabilized N-heterocyclic oxoboranes: their facile synthesis from a borinic acid. *AngewChemInt Ed Engl.* 2011; 50: p. 2816-2819.
41. Fei, L. et al., Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: p. 646-655.
42. Deng, Z. et al., Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology.* 2009; 20: p. 455101.
43. Greenwald, R. et al., A new aliphatic amino prodrug system for the delivery of small molecules and proteins utilizing novel PEG derivatives. *J Med Chem.* 2004; 47: p. 726734.
44. Duguet, E. et al., Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond).* 2006; 1: p. 157-68.
45. Tsai, D. et al., Competitive adsorption of thiolated polyethylene glycol and mercaptopropionic acid on gold nanoparticles measured by physical characterization methods. *Langmuir.* 2010; 26: p. 10325-10333.
46. Jokerst, J. et al., Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2011; 6: p. 715-728.
47. Cauda, V. et al., Impact of different PEGylation patterns on the long-term biostability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2010; 20: p. 8693-8699.
48. Aggarwal, P. et al., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61: p. 428-437.
49. Yang, X. et al., Nanoparticles for photoacoustic imaging. *Wiley Interdiscip Rev NanomedNanobiotechnol.* 2009; 1: p. 360–368.
50. Copland, J. et al., Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography. *Mol Imaging Biol.* 2004; 6: p.341–349.
51. de la Zerda, A. et al., Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice. *Nano Lett.* 2010; 10: p. 2168–2172.
52. Wang, L. et al., Prospects of photoacoustic tomography. *Med Phys.* 2008; 35: p. 5758–5767.
53. Zhang, Q. et al., Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography. *Nanotechnology.* 2009; 20: p. 395102.
54. Oh, E. et al., Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size. *ACS Nano.* 2011; 5: p. 6434-6448.
55. Li, S. et al., Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008; 5: p. 496-504.
56. Niidome, T. et al., PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J Control Release.* 2006; 114: p. 343-347.
57. Chithrani, B. et al., Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006; 6: p. 662-668.
58. Ghandehari H. et al., Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *J ApplToxicol.* 2010; 30: p. 212-217.
59. Xie, X et al., The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Sci Rep.* 2017; 7: p. 3827.

60. Cartiera, M. et al., The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*. 2009; 30: p. 2790-2798.
61. Hirn, S et al., Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011; 77: p. 407-416.
62. Xie, J et al., Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett*. 2009; 9: p. 1080-1084.
63. Leroueil, P. et al., Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett*. 2008; 8: 420-424.
64. Lin, J. et al., Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano*. 2010; 4: 5421-5429.
65. Duguet, E. et al., Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2006; 1: p. 157-168.
66. Fischer, H. et al., Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes, Influence of physico-chemical properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 31: p. 32-42.
67. Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4: p. 49-60.
68. Barnham, K et al., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3: p. 205-214.
69. Hamley, I. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem Rev*. 2012; 112: 5147-5192.
70. Scott, L et al., Medicinal inorganic chemistry approaches to passivation and removal of aberrant metal ions in disease. *Chem Rev*. 2009; 109: p. 4885-4910.
71. Gaggelli E et al., Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev*. 2006; 106: p. 1995-2044.
72. Ghiam, Y et al., Amyloid  $\beta$ -protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: p. 3231-3246.
73. Meng, L et al., Using Multifunctional Peptide Conjugated Au Nanorods for Monitoring  $\beta$ -amyloid Aggregation and Chemo-Photothermal Treatment of Alzheimer's Disease. *Theranostics*. 2017; 7: p. 2996-3006
74. Kogan, M. et al., Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013; 5: p. 4076-4085.
75. Kogan, M. et al., Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine*. 2010; 5: p. 897-913.
76. Pardridge W. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007; 12: p. 54-61.
77. Spuch C. et al., Transport Mechanisms at the Blood-CerebrospinalFluid Barrier: Role of Megalin LRP2. *Rec Pat EndocMetabImmun Drug Discov*. 2010; 4: p. 190-205.
78. Abbott N. et al., Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: p. 41-53.
79. Cecchelli, R. et al., Modelling the BBB in drug Discovery and development. *Nat Rev Drug Discover*. 2007; 6: p. 650-661.
80. Dogrukol-Ak, D. et al., Passage of vasoactive intestinal peptide across the blood brain barrier. *Peptides*. 2003; 24: p., 437-44.

81. van Rooy, I. et al., In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain. *Pharm Res.* 2011; 28: p. 456-471.
82. Fernandez-Carneado, J. et al., Potential Peptide Carriers: Amphipathic Proline-Rich Peptides Derived from the N-Terminal Domain of  $\alpha$ -Zein. *Angewandte Chemie International Edition.* 2004; 43: p. 1811-1814.
83. Patridge, W. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005; 2: p. 3-14.
84. Wang Y. et al., Receptor-Mediated Transport of Drugs Across the BBB. *Immunotherapy.* 2009, 1: 983-989.
85. Mei, L. et al., Angiopep-2 and activatable cell penetrating peptide dual modified nanoparticles for enhanced tumor targeting and penetrating. *International Journal of Pharmaceutics.* 2014; 1: p. 95-102.
86. Demeule, M. et al., Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J PharmacolExpTher.* 2008; 324: p. 1064–7102.
87. Bertrand, Y. et al., Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics. *J. Cell. Mol.* 2010; 14: p. 2827-2839.
88. Demeule M. et al., Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem.* 2008; 106: p. 1534–1544.
89. Acarregui, M. et al., Characterization of CD34+ cells isolated from human fetal lung. *Am J Pathol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284: p. 395–401.
90. Zhang C. et al., The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am J Pathol.* 2009; 174: p. 586–594.
91. Lewinski, N. et al., Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* 2008, 4: p. 26-49.
92. Nel, L et al., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat. Mater.* 2009; 8: p. 543–557.
93. A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science.* 2006; 311: p. 622–627.
94. Xia, M et al., Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties, *ACS Nano.* 2008; 2: p. 2121–2134.
95. Auffan, W et al., Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*, *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42: p. 6730–6735.
96. Foley, C et al., Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294: p. 116–119.
97. Kamat, T et al., Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications, *Toxicology.* 2000; 155: p. 55–61.
98. Cottingham, M et al., Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide, *Biochemistry.* 2002; 41: p. 13539–13547.
99. Gou, A et al., Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis, *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: p. 5964–5970.
100. Walczyk, F et al., What the Cell “Sees” in Bionanoscience, *J. Am. Chem. Soc.* 2010; 132: p. 5761–5768.



101. Leroueil, S et al., Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers, *Nano Lett.* 2008; 8: p. 420–424.
102. Hussain, K et al., In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol. In Vitro* 2005; 19: p. 975–983.
103. Navarro, A et al., Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, *Ecotoxicology.* 2008; 17: p. 372–386.
104. Øvrevik, M et al., Refsnes, p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells, *Toxicol. Sci.* 2004; 81: p. 480–490.
105. Hauck, A et al., Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small.* 2008; 4: p. 153–159.
106. Billsten, P et al., Adsorption to silica nanoparticles of human carbonic anhydrase II and truncated forms induce a molten-globule-like structure, *FEBS Lett.* 199; 7402: p. 67–72.
107. Chen, A et al., Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Exp. Cell Res.* 2005; 305: p. 51–62.
108. Jiang, W. et al., Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* 2008; 3: p. 145-150.
109. Isomaa, B et al., The subacute and chronic toxicity of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), a cationic surfactant, in the rat. *Arch Toxicol.* 1976; 35: p. 91-96.
110. Mortimer, J et al., The solvatochromic comparison method. I. The beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. *J. Am. Chem. Soc.* 1976; 98: p. 377–383.
111. Link, S. et al., Spectroscopic determination of the melting energy of a gold nanorod. *The Journal of Chemical Physics.* 2001; 114: p. 2362-2368.
112. Du, S et al., Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. *J Nanopart Res.* 2012; 14: p. 75.
113. Riss, T. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.* 2013.
114. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *CurrProtoc Immunol.* 2001. Appendix 3: Appendix 3B.
115. Ge J, et al., Standard Fluorescent Imaging of Live Cells is Highly Genotoxic. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology.* 2013; 83: p. 552-560.
116. Cunningham R. Overview of flow cytometry and fluorescent probes for flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010; 588: p. 319-326.