



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA

NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MEDIANTE EL USO DE MICRO-CT

PATROCINANTE

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de Toxicología
Departamento de Química Farmacológica
y Toxicología

DIRECTORES DE MEMORIA

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de Toxicología
Departamento de Química Farmacológica
y Toxicología

Codirector
Dr. Simón Guerrero
Laboratorio de Toxicología
Departamento de Química Farmacológica
y Toxicología

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Fernando Javier Toro Carrasco

SANTIAGO DE CHILE
2020

“No hay nada en el mundo que capacite tanto a una persona para sobreponerse a las dificultades externas y a las limitaciones internas, como la consciencia de tener una tarea en la vida”

Viktor Frankl

Agradecimientos

Espero poder plasmar todo mi agradecimiento hacia todas las personas que me acompañaron en este largo y arduo camino.

Quiero agradecer a mi familia, a mi madre Cecilia, padre Ricardo y a mi hermana Mariana, por soportar mi mal humor y mi ausencia en los momentos familiares. Gracias a ellos estoy donde estoy y les debo todas y cada una de mis victorias. Este trabajo esta dedicado completamente a ustedes, ya que sin su apoyo nunca hubiese llegado tan lejos.

Agradecer a mis primos, Sebastián y Constanza por ayudarme desde siempre en mis obligaciones académicas y por alentarme siempre en mis tareas.

Agradezco a mis abuelos, Corina y Héctor, por estar siempre cuidándome, desde que tengo memoria, nunca dejaron de apoyarme y darme ánimos para seguir adelante y llegar lo más lejos posible. Mil gracias a mi pequeña Isadora por acompañarme en el tramo final de esta etapa de mi vida.

Agradecer al profesor Marcelo Kogan por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta investigación y contribuir en mi desarrollo como profesional. También quiero agradecer a toda la gente del laboratorio, especialmente a Pancho, Peter y Simón, gracias por todo el tiempo que destinaron a ayudarme en este desafío, sin la ayuda de ustedes, este no habría llegado a buen puerto...se los agradezco de corazón.

Agradecer a la Plataforma Experimental Bio-CT, perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FONDEQUIP EQM150010), por realizar el análisis mediante el uso de tecnología Micro-CT. Agradezco de todo corazón a la Dany, por toda la paciencia y tiempo que le diste a este trabajo.

Agradecer a los técnicos, Luis Saez, José y Mario Riquelme, Claudio Fernández, Manuel Calvipán, por todas las buenas intenciones y por todas las veces que me libraron de algún llamado de atención de los profesores.

No puedo dejar de agradecer a todos mis amigos, en especial a mi círculo más cercano, gracias a ellos es que pude mantenerme siempre de pie y terminar esta carrera. Gracias a Mane y Maite, mis dos mamás universitarias. A Alfi por siempre demostrarme que por más problemas que se tenga al frente, todos tienen una solución. A mi partner Negrete, nos acompañamos durante toda la carrera; en los buenos y malos momentos; siempre estuvo ahí, lo aprecio como a pocos en este mundo.

Agradecer a mis compadres, Tomas, Gabriel, Antonio y Vicente, jamás olvidaré las tertulias tomando té bajo el sol abrazador que azotaba la facultad.

También no puedo olvidar a mis amigos mayores. A Paula por todo el tiempo que se tomó para aconsejarme y escuchar mis problemas; y por todas las reflexiones que hacíamos tomando té. Como no olvidar al Nene; disculpas por la cantidad de veces que lo molesté y le di más un problema al preguntarte de orgánica, gracias a él salí adelante y comprendí una materia que jamás pensé que entendería.

Igualmente quiero agradecer de forma muy especial a Javier Campanini, quien me instruyó sobre el mundo de la ciencia y me entregó todas las bases para que esta investigación fuera posible.

Contenidos

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. Introducción	4
1.1 Cáncer.....	4
1.2 Micro CT.....	5
1.3 Nanopartículas de oro y sus aplicaciones como agentes de contraste para rayos X	6
1.4 Ácido fólico.....	10
2. Hipótesis y Objetivos	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivos Generales.....	13
2.3 Objetivos Específicos.....	13
3. Materiales y métodos	14
3.1 Síntesis de nanoesferas (AuN's)	15
3.2 Conjugación de nanoesferas con PEG y Acido Fólico (FA).....	16
3.2.1 Conjugación de AuN's con PEG.....	16
3.2.2 Conjugación AuN's con ácido fólico.....	17
3.3 Caracterización de nanopartículas de oro (AuN's) y sus conjugados AuN-PEG, AuN-PEG-FA.....	18
3.3.1 Espectrofotometría UV-visible (UV-vis).....	18
3.3.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	19
3.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (modo STEM).....	19
3.4 Determinación de la concentración óptima del nanosistema AuN-PEG-FA....	20
3.5 Cuantificación <i>in-vitro</i> de células B16F10 cargadas con AuN-PEG-FA.....	20
4. Resultados y Discusión	21
4.1 Síntesis y caracterización nanopartículas de oro funcionalizadas con folato (AuN-PEG-FA).....	21
4.2 Determinación de la concentración óptima del nanosistema AuN-PEG-FA...	25
4.3 Determinar in vitro la cantidad mínima de células (B16F10-AuN-PEG-FA) detectables en equipo Micro-CT.....	26
5. Conclusiones y Perspectiva	29

6. Referencias	30
7. Anexo I	34
8. Anexo II	37

Índice de Figuras

Fig. 1.3.1 Atenuación de Rayos X al interactuar con la materia.....	7
Fig. 1.3.2 Posibles conjugaciones no covalentes de nanopartículas a proteínas (azul), drogas (verde), ADN.....	8
Fig. 1.3.3 Esquema de reacción para la funcionalización de AuN-PEG con Ácido Fólico mediante la activación del terminal carboxilo del PEG (mediante la activación EDC/NHS) y el terminal amino del ácido fólico.....	9
Fig. 1.4.1 Visión general del ciclo del folato.....	10
Fig. 1.5 Esquema que representa la estrategia de incubación para la incorporación del nanosistema AuN-PEG-FA dentro de las células B16F10 para su posterior detección por micro-CT.....	12
Fig. 3.2.1 Esquema de conjugación de AuN's con SH-PEG5000-OMet y SH-PEG5000-COOH.....	16
Fig. 3.2.2 Esquema de conjugación de AuN's con ácido fólico.....	17
Fig. 3.2.3 Esquema de la reacción de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS)	18
Figura 4.1 Espectros de absorción de las nanopartículas de oro sin funcionalizar y funcionalizadas.....	21
Fig. 4.1.1 Nanosistema AuN-PEG FA.....	23
Fig. 4.1.2 Imagen obtenida por Microscopía electrónica (STEM) del nanosistema AuN-PEG-FA (A); Histograma de la Frecuencia relativa vs diámetro del nanosistema AuN-PEG-FA (B).....	24
Fig. 4.2.4 Gráfico de Concentración de nanopartículas v/s volumen.....	25
Fig. 4.3 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA.....	27
Fig. 4.3.5 Gráfico de número de células cargadas con nanosistema AuN-PEG-FA vs volumen detectado.....	28
Fig. A1.1 Histograma con opacidad ajustada de la solución de nanopartículas.....	34

Fig. A1.2 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las nanopartículas.....	35
Fig. A1.3 Histograma con la opacidad ajustada, nanopartículas en color rojo y tubos en color azul.....	36
Fig. A1.4 Imagen con la opacidad ajustada, nanopartículas en color rojo y tubos en color azul.....	36
Fig. A2.1 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA. Las células cargadas con el nanosistema aparecen en color gris.....	37
Fig A2.2 Histograma con opacidad ajustada, células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA en rojo y tubos en color azul.....	37
Fig A2.3 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA (en rojo).....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Dh y pZ en las diferentes etapas de funcionalización de las nanopartículas.....	22
--	----

Abreviaturas

AuN's	Nanoesferas de oro.
AuN-PEG	Nanoesferas de oro recubiertas con polietilenglicol.
AuN-PEG.	Nanopartículas de oro conjugadas con SH-PEG-COOH y SH-PEG-OMe.
AuN-PEG-FA	Nanoesferas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y ácido fólico.
DLS	Dispersión dinámica de la luz.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
FA	Ácido fólico
NHS	N-hidroxisuccinimida.
PEG	Polietilenglicol.
HS-PEG-COOH	Polietilenglicol tiolado con terminal carboxilo
HS-PEG-OMe	Polietilenglicol tiolado con terminal metoxilo
STEM	Microscopía electrónica de transmisión.

Resumen

En la actualidad el principal problema con los tratamientos para el cáncer es que en ciertos casos no se logra el balance adecuado entre la destrucción del tejido cancerígeno y la destrucción del tejido sano, principalmente por la falta de selectividad en el tratamiento. También, otra de las limitaciones es la falta de metodologías que permitan la detección temprana de los tumores.

Recientemente se han desarrollado nuevas herramientas basadas en nanotecnología que permiten detectar en forma temprana el cáncer, mejorando el pronóstico y la sobrevivencia del paciente. Es así como las nanopartículas de oro funcionalizadas poseen interesantes propiedades como una acumulación selectiva en tumores y por ser elementos con gran masa nuclear son útiles como agentes de contraste permitiendo mejorar la detección de células tumorales *in vivo*.

En este escenario, el uso de la tomografía computarizada (CT) en conjunto con nanopartículas de oro tiene un futuro prometedor, ya que es una técnica no invasiva, de bajo costo y que entrega imágenes en 3D de alta calidad y resolución, dado el alto coeficiente de atenuación frente a los rayos X que presentan las nanopartículas. Es así como en la presente memoria se evaluó el potencial uso de nanopartículas de oro para la detección sensible de células tumorales de melanoma (B16F10) que producen metástasis *in vivo* en ratón.

De este modo se propone la utilización de una plataforma de detección basada en la utilización de nanoesferas de oro, que, mediante la funcionalización de su superficie con ácido fólico, facilite la internalización celular aumentando así la selectividad sobre células cancerígenas. Este nanosistema sensible y afín por células tumorales será internalizado, facilitando así la detección de las células por tomografía computarizada (Micro-CT).

Las células B16F10 (melanoma) se marcaron con nanopartículas de oro esféricas de 12 nm funcionalizadas con ácido fólico. Las mencionadas células presentan sobreexpresión de receptores del ácido fólico favoreciéndose así la endocitosis de las nanopartículas funcionalizadas mediada por receptores.

Posteriormente, se evaluó por la técnica de tomografía computarizada el mínimo número de células detectable. Es así que se logró la detección de 25000 células lo que podría equipararse a un tumor de 0,25 mm.

En un futuro se realizarán estudios *in vivo* para evaluar la sensibilidad de detección de células con el fin de detectar tempranamente el proceso de la metástasis.

Summary

At present, the main problem with cancer treatments is that in certain cases the adequate balance between the destruction of the carcinogenic tissue and the destruction of healthy tissue is not achieved, mainly due to the lack of selectivity in the treatment. Likewise, another of the limitations is the lack of methodologies that allow early detection of tumors.

Recently, new nanotechnology-based tools have been developed that allow cancer to be detected early, improving the patient's prognosis and survival. This is how functionalized gold nanoparticles have interesting properties such as a selective accumulation in tumors and because they are elements with large nuclear mass they are useful as contrast agents allowing to improve the detection of tumor cells in vivo. In this scenario, the use of computed tomography (CT) in conjunction with gold nanoparticles has a promising future, since it is a non-invasive, low-cost technique that delivers high-quality 3D images and resolution, given the high attenuation coefficient against the x-rays presented by the nanoparticles. Thus, the potential use of gold nanoparticles for the sensitive detection of melanoma tumor cells (B16F10) that produce metastases in vivo in mice was evaluated herein. Thus, the use of a detection platform based on the use of gold nanospheres is proposed, which, by functionalizing its surface with folic acid, facilitates cell internalization, thereby increasing selectivity on cancer cells. This sensitive and related nanosystem by tumor cells will be internalized, thus facilitating the detection of cells by computed tomography (Micro-CT). B16F10 cells (melanoma) were labeled with spherical gold nanoparticles of 12 nanometers functionalized with folic acid. The aforementioned cells exhibit overexpression of folic acid receptors thus favoring endocytosis of functionalized receptor-mediated nanoparticles.

Subsequently, the minimum number of detectable cells was evaluated by computed tomography. Thus, the detection of 25,000 cells was achieved, which could be equated with a 0.25 mm tumor. In the future, in vivo studies will be carried out to evaluate the sensitivity of cell detection in order to detect the metastasis process early.

1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es una patología que incluye un conjunto de fenómenos lo que reviste una alta complejidad en el diagnóstico y en el tratamiento [2]. La aparición del cáncer ha ido incrementando en la población debido al aumento y envejecimiento de la misma [2].

Según estimaciones realizadas en el proyecto GLOBOCAN (proyecto de salud llevado a cabo por la *International Agency for Research on Cancer*) en 2018, 18,1 millones de casos nuevos fueron diagnosticados, de los cuales 9,5 millones aproximadamente terminaron en muerte [3].

Los países menos desarrollados son los más afectados, debido a que la incidencia de casos nuevos alcanza un 57% y la tasa de mortalidad es de un 65% [2]. El cáncer de pulmón (11,6% de los casos nuevos) y mama (11,6% de los casos nuevos) constituyen las principales causas de muerte en hombres y mujeres, respectivamente, a nivel mundial [2, 3].

En Latinoamérica se estima que para el 2030 serán diagnosticados cerca de 1.7 millones de casos anuales, de los cuales 1 millón de diagnósticos tendrán un desenlace fatal [4, 5]. En Chile, actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte de la población, luego de las afecciones al sistema cardiovascular, proyectándose que al final de la próxima década, llegue a ser la primera causa de muerte en el país[6] .

Sólo en 2018, en Chile, fueron diagnosticados 53.365 casos, de los cuales 28.443 terminaron en muerte, llegando así a un 53,3 % de mortalidad. De los nuevos casos diagnosticados, un 12,3% corresponde a cáncer de próstata, 11,1% corresponde a cáncer colorrectal y un 10,1 % a cáncer de mama [3].

En la actualidad la problemática que existe en torno al tratamiento del cáncer es la detección oportuna del mismo. Es por tanto, un desafío desarrollar nuevos métodos de detección que permitan determinar la presencia de células tumorales oportunamente, facilitado así la terapia farmacológica y/o radiológica, como, por ejemplo, la utilización de quelantes de DNA, como el cisplatino, sumado a radioterapia de rayos X [7].

Hoy en día, las 2 técnicas más utilizadas para la detección de tumores son la tomografía por emisión de positrones (PET)[8] y la resonancia nuclear magnética (RMN). El PET presenta una alta sensibilidad y una mala resolución, en cambio la RMN presenta una buena resolución y una baja sensibilidad. Sus más grandes y notorias desventajas son su elevado costo, la utilización de un medio de contraste para RMN y el uso de una sonda radioactiva para el PET y el bajo número de equipos que están disponibles en Chile. Cabe mencionar que esta última técnica requiere de la preparación de sondas radioactivas que presentan una baja vida media y también el disponer de un sincrotrón para preparar dichas sondas radioactivas cerca del lugar en donde está instalado el equipo para PET.

La Tomografía Axial Computarizada (TAC) es otra técnica utilizada para la detección de tumores. Como técnica, posee una mayor accesibilidad a equipos y un bajo costo, pero tiene una baja resolución y sensibilidad en tejido blando, lo cual podría mejorarse utilizando nanopartículas de oro[9, 10].

En esta memoria nos enfocaremos en la técnica de CT (tomografía computarizada), utilizando un equipo de microtomografía computarizada (Micro-CT).

1.2 Micro-CT

En la actualidad, uno de los mayores obstáculos para la detección y tratamiento de distintos tipos de cánceres, es la capacidad de hacer un seguimiento mediante imágenes [11]. Distintos métodos como ultrasonido, tomografía de emisión de positrones (PET) o resonancia magnética (MR) han sido de gran ayuda para el seguimiento y captura de imágenes.

Mediante *Micro Computed-Tomography* (Micro-CT) o Microtomografía-Computarizada se obtienen imágenes de alta calidad y definición [12]. Caracterizada por una alta resolución espacial y temporal, la técnica de Micro-CT permite determinar grados de atenuación de rayos X en distintos tejidos, por lo que surge como una herramienta de imagen conveniente para los hospitales en términos de viabilidad, eficiencia y costo [12] [13]. La técnica se basa en la atenuación de los rayos X, ya que dependiendo de la densidad y composición del tejido este atenuará de forma distinta los rayos X, es decir, tejidos densos como el hueso tendrán una atenuación mayor que tejidos blandos [14].

Utilizando esta técnica, sin la utilización de medios de contraste, se han detectado tumores de alrededor de 0,56 mm, lo que correspondería a la detección de 56.000 células [15] [16].

Uno de los agentes de contraste más utilizados es el yodo, el cual presenta una alta toxicidad renal, llegando a producir una nefropatía inducida por contraste debido a la producción de radicales libres y la inducción de apoptosis [17, 18].

El gran problema de esta técnica es la baja resolución y sensibilidad, lo cual dificulta la observación de tejidos blandos sin la utilización de un medio de contraste. Debido a esto nosotros proponemos la utilización de nanopartículas de oro, las cuales reportan ser un gran medio de contraste para la observación de tejidos blandos [14].

1.3 Nanopartículas de oro y sus aplicaciones como agentes de contraste para rayos X

Actualmente, la nanotecnología ha avanzado en el campo de la detección de cánceres, debido a las características intrínsecas de los nanomateriales, tales como las fototérmicas y plasmónicas de superficie. Por ejemplo, las nanopartículas de oro, al ser irradiadas con un láser, aumentan su temperatura utilizándose para la destrucción selectiva de células tumorales [19].

Las nanopartículas de oro han emergido como una de las nuevas nanoplataformas de diagnóstico, obtención de imagen, monitoreo, tratamiento de diferentes enfermedades entre otras aplicaciones biomédicas [20, 21].

Las nanopartículas de oro han sido utilizadas para mejorar el contraste vascular y mejorar la delineación de estructuras de tejido blando [22]. Al utilizar la micro-CT en conjunto con nanopartículas de oro se obtienen imágenes de gran contraste, distinguiéndose distintos tipos de tejidos suaves. La atenuación de rayos X, es la disminución de la intensidad de estos al interactuar con la materia. La capacidad que tiene la materia para atenuar los rayos X dependerá del número atómico y la densidad, que es conocido como el coeficiente de atenuación [13]. El oro, al poseer un número atómico alto ($Z=79$), induce una atenuación de rayos X muy alta, por lo que entrega mejores contrastes a bajas dosis, aumentando la sensibilidad y especificidad del método [23-28].

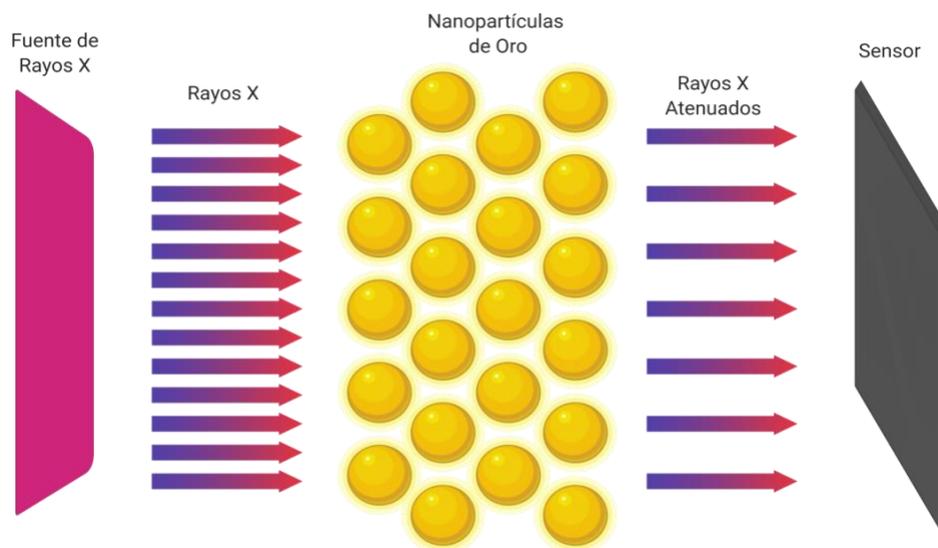


Fig. 1.3.1 Atenuación de Rayos X al interactuar con la materia

Actualmente, existen pocas investigaciones en las que se utilicen las nanopartículas de oro como herramienta para la marcación de células y la detección de las mismas empleando un equipo de micro-CT *in vivo*[29-31]. Cabe mencionar que éste es el único trabajo en el cual se marcarán células tumorales metastásicas de la línea B16F10 de melanoma que realizan metástasis en pulmón para poder detectarlas con micro-CT. El interés de este trabajo es poder desarrollar una herramienta que permita hacer el seguimiento *in vivo* de la temporalidad del proceso metastático de las células. Todo esto en el contexto de un trabajo realizado previamente en el que se estudió *ex vivo* la distribución de las mismas células B16F10 marcadas con nanopartículas de oro con el fin de detectar estadios tempranos del proceso de la metástasis [32].

Funcionalización de nanopartículas para aplicaciones en biomedicina.

Las nanopartículas de oro poseen gran reactividad química y propiedades ópticas, lo cual, las hace un elemento interesante de investigar para el diagnóstico selectivo de células cancerígenas [33]. Las nanopartículas de oro poseen baja toxicidad y su acumulación mayoritaria se localiza en hígado y riñones, en donde, produce un bajo daño oxidativo [33]. Las nanopartículas pueden ser conjugadas (Fig. 1.3.2) con distintas moléculas como polietilenglicoles (PEG's) los cuales forman un enlace

covalente coordinado debido a que, el tiol, es quemiadsorbido por la superficie cargada de la nanopartícula [19, 34].

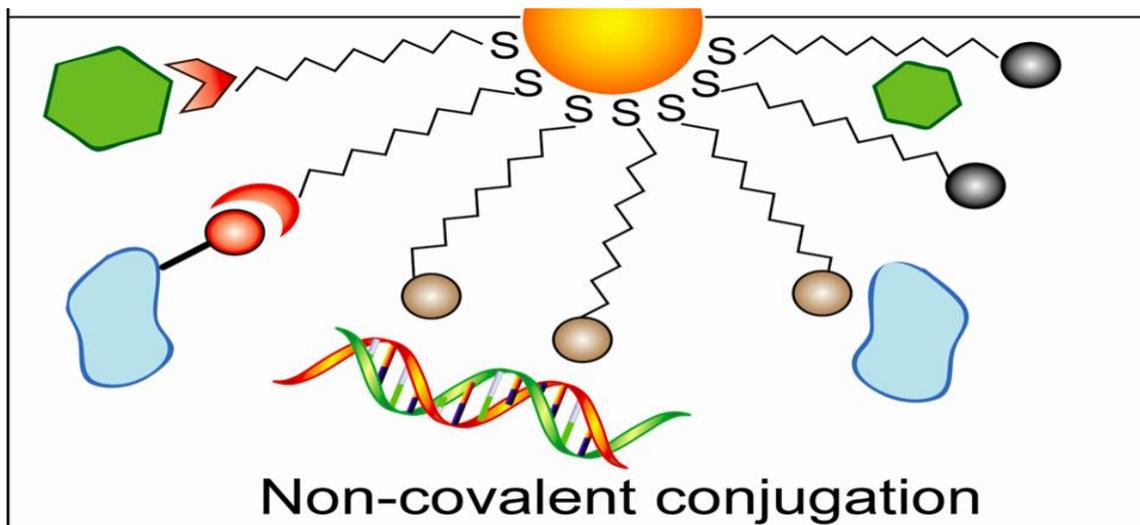


Fig. 1.3.2 Posibles conjugaciones no covalentes de nanopartículas a proteínas (azul), drogas (verde), ADN. [35]

Al conjugar con diferentes moléculas la superficie de las nanopartículas podemos lograr estabilizarla, mediante estabilización de carga e impedimento estérico evitando así fenómenos de agregación [36]. En este trabajo, fueron adicionados 2 tipos de PEG's, uno de ellos es el HS-PEG5000-OMe utilizado como estabilizador por efecto estérico de la nanopartícula, y el HS-PEG5000-COOH como nexo entre la nanopartícula y moléculas como el ácido fólico que permiten la internalización celular a través de receptores que median dicha internalización celular [36]. Así mismo, cabe destacar que PEG's de estos tamaños son ideales ya que ayudan a biocompatibilizar a las nanopartículas disminuyendo las interacciones con macromoléculas como las proteína, siendo esto importante para aumentar el tiempo de vida media en el plasma y disminuir la acumulación en ciertos órganos como riñón, hígado y bazo [33].

Se utilizaron nanoesferas de oro (AuN's) de oro de 12 nm para ser internalizadas en las células tumorales que se detectarán *in vitro*. El tamaño de las AuN's juega un rol fundamental en el proceso de internalización celular, se ha observado en estudios anteriores que nanopartículas de alrededor de 5 nm son internalizadas por difusión pasiva, mientras que nanopartículas de entre 20 a 50 nm son internalizadas

por vías endocíticas [23, 37]. A partir de esto es posible aseverar que la captación celular de las AuN es inversamente proporcional a su tamaño. Es importante mencionar que la internalización de nanopartículas también puede variar según la línea celular [38].

Existen métodos para mejorar el direccionamiento, captación e internalización de las AuN's, en este caso utilizaremos la conjugación de estas con un ligando específico, el ácido fólico. Estudios anteriores han evaluado el efecto tanto *in vitro* como *in vivo* de la unión de ácido fólico a nanopartículas [1] indicando que la conjugación de AuN's con ácido fólico (Fig. 1.3.3) mejora la selectividad hacia células y tejidos tumorales, aumentando la captación e internalización celular a través de endocitosis mediada por FR α [39] [40].

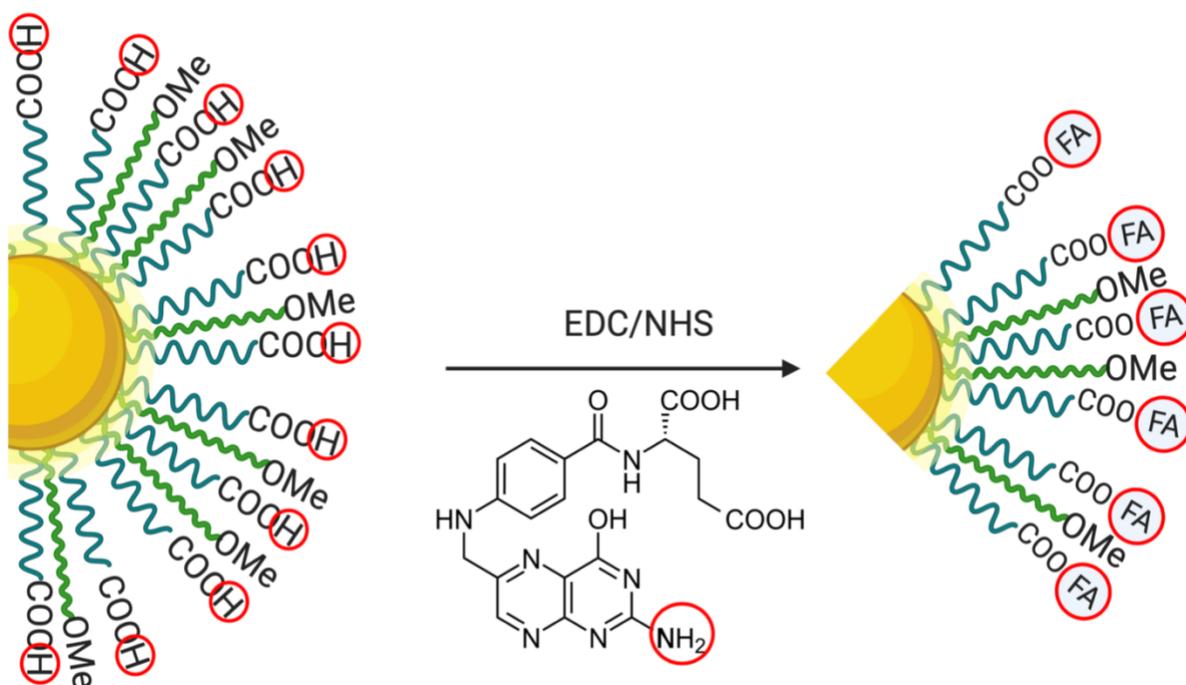


Fig. 1.3.3 Esquema de reacción para la funcionalización de AuN-PEG con ácido fólico mediante la activación del terminal carboxilo del PEG (mediante la activación EDC/NHS) y el terminal amino del ácido fólico.

1.4 Ácido fólico

El ácido fólico o folato (en su forma sintética), es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B (también llamado Vitamina B9). Es crítico para la síntesis, metilación y reparación (síntesis de timina) de DNA [41]. El ácido fólico es de un tamaño pequeño (441 Da), estable en un amplio rango de temperaturas y pH, de bajo costo, no inmunogénico y mantiene su habilidad de unirse al receptor de folato después de ser conjugado con fármacos o marcadores de diagnóstico [42].

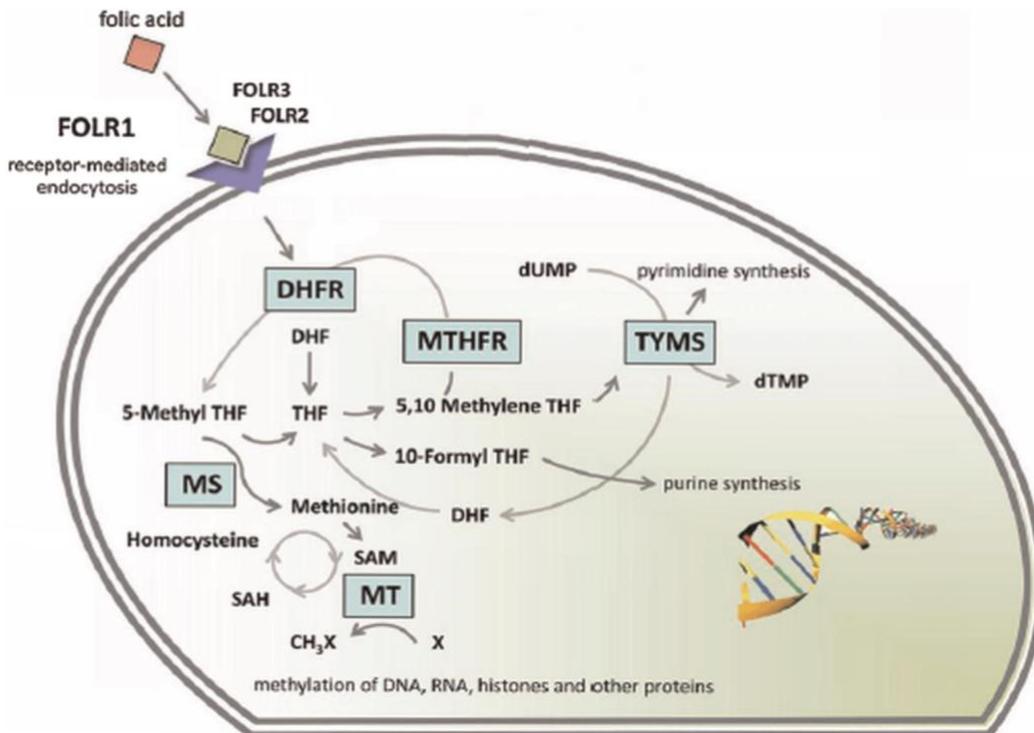


Fig. 1.4.1 Visión general del ciclo del folato[1]

El folato participa como precursor en la síntesis de purinas y pirimidinas, y en vías que están estrictamente relacionadas con la metilación de ADN, ARN, histonas y proteínas (Fig. 1.4.1) [1]. La hipometilación de DNA también está asociado a bajos niveles de folato, lo cual puede conducir a una inadecuada expresión de proto-oncogenes [43-47].

El receptor de folato es un receptor de tipo glicosilfosfatidilinositol anclado a la superficie de la membrana celular, expresado en la gran mayoría de los tejidos cancerígenos (epitelio ovárico, cervical, pulmonar, renal, colorrectal) [41]. La expresión en tejido normal se restringe a tejido pulmonar, renal, placenta y plexo coroideo [48].

La línea celular tumoral B16F10, proveniente de ratón (*mus musculus*) melanoma de piel de ratón, tiene una sobreexpresión del receptor de folato (FOLR1)[49], por esta razón, el folato podría utilizarse como una molécula para realizar un direccionamiento activo capaz de permear dentro de células cancerígenas, permitiendo así ser detectadas posteriormente por técnicas de imagenología.

En el presente trabajo se obtendrán nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico que permitan la internalización celular. El nanosistema será internalizado mediante endocitosis mediada por caveolas [50] en las células tumorales que sobreexpresan el receptor de ácido fólico facilitando así el contraste para una detección ultrasensible por Micro-CT, es decir, mediante esta técnica seremos capaces de detectar pequeños cúmulos de células en estadios más tempranos antes de que formen un tumor. De esta manera se determinará cual es el menor número de células a detectar (*in vitro*) para que en estudios posteriores se determine *in vivo* el mínimo número de células tumorales para potencialmente identificar un proceso de metástasis.

Incubación de células B16F10 con una concentración de 4nM del nanosistema AuN-PEG-FA, a 37°C por 24 Horas

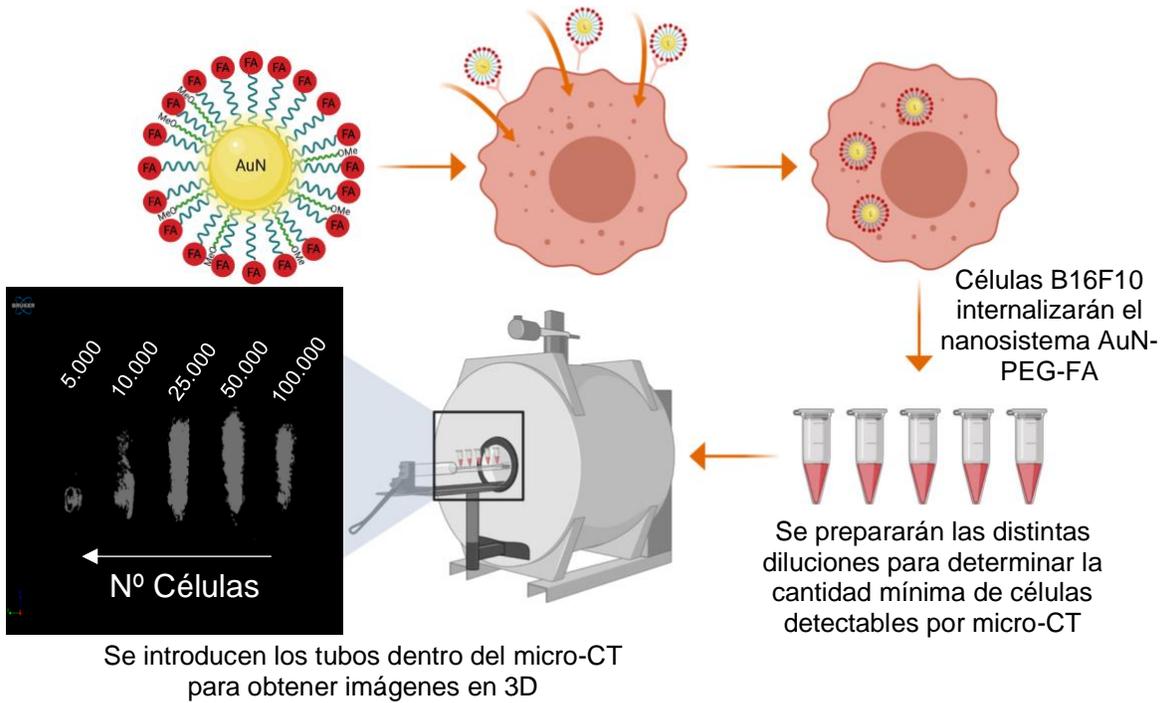


Fig. 1.5 Esquema que representa la estrategia de incubación para la incorporación del nanosistema AuN-PEG-FA dentro de las células B16F10 para su posterior detección por micro-CT

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Es posible la detección ultrasensible de células tumorales por Micro-CT mediante el uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con folato.

2.2 Objetivo General

Utilizar nanopartículas de oro funcionalizadas con folato para detectar células tumorales mediante Micro-CT.

2.3 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro funcionalizadas con folato (AuN-PEG-FA).
2. Determinar de la concentración óptima del nanosistema AuN-PEG-FA.
3. Determinar *in vitro* de la cantidad mínima de células (B16F10-AuN-PEG-FA) detectables en equipo Micro-CT.

3. Materiales y Métodos

Materiales

Para este trabajo se utilizaron los siguientes materiales: Sal áurica (HAuCl_4) (P.M. 339,79), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (P.M. 191,7), N-hidroxisuccinimida (NHS) (P.M. 115,09), citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (P.M. 294,1), ácido fólico (P.M. 441,4), buffer fosfato salino (PBS)(Sigma-Aldrich) y buffer MES (Sigma-Aldrich). Los polímeros HS-PEG₅₀₀₀-COOH y HS-PEG₅₀₀₀-OMe (P.M. 5000) fueron obtenidos por la empresa Jenkem Technology desde Beijing, China.

Para el cultivo celular, se usó la línea celular de melanoma B16F10, adquirida por medio de ATCC. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (GIBCO, USA)

Previo a la síntesis de AuN's, todo el material de vidrio utilizado debió estar limpio y libre de cualquier posible contaminante, para esto se dejó en una solución de Extrán al 2% durante una noche; al día siguiente se enjuagó con agua, para posteriormente hacer un lavado con una solución de agua regia (3:1 HCl/ HNO_3) por un tiempo de 30 minutos. Finalmente, se realizaron lavados sucesivos con agua Milli-Q (18,2M Ω cm).

Cabe agregar que todas las soluciones empleadas en este trabajo fueron preparadas con agua Milli-Q [51, 52].

3.1 Síntesis de nanoesferas (AuN)

La obtención de AuN's de un tamaño cercano a los 12nm se llevó siguiendo el protocolo descrito por Levy R. y Cols [53], basado en la síntesis descrita por Turkevich y Cols [54], que consiste en la reducción de la sal áurica HAuCl_4 con citrato trisódico como agente reductor y estabilizante.

Primero, se prepararon 100 mL de una solución acuosa de HAuCl_4 1mM (Aldrich, pureza 99,9%, P.M. 339,79) en un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 250 mL. El matraz se colocó en una manta calefactora, con agitador magnético, y se conectó a un sistema de reflujo simple. Luego de lograr una agitación continua, se cubrió con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, y se calentó a reflujo constante a una temperatura cercana a los 190°C por 10 minutos.

Paralelamente, se preparó una solución de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Aldrich, pureza 99%, PM 294.1g/mol) en una concentración de 38,8 mM, la cual se calentó por microondas, hasta que la solución alcanzó una temperatura cercana a los 60°C . Se tomó un alícuota de 10 mL y fue adicionada rápidamente al balón de 2 bocas donde se encontraba la solución de AuN's. La mezcla en agitación constante (manteniendo el reflujo) por exactamente 30 minutos, posterior a la adición de citrato. Luego el balón fue retirado de la manta calefactora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez fría la solución de AuN's, esta fue filtrada con un filtro de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$, se ajustó el pH final cercano a 9 y fueron almacenadas a 4°C . [53, 55]

3.2 Conjugación de nanoesferas con PEG y Acido Fólico (FA)

3.2.1 Conjugación de AuN's con PEG

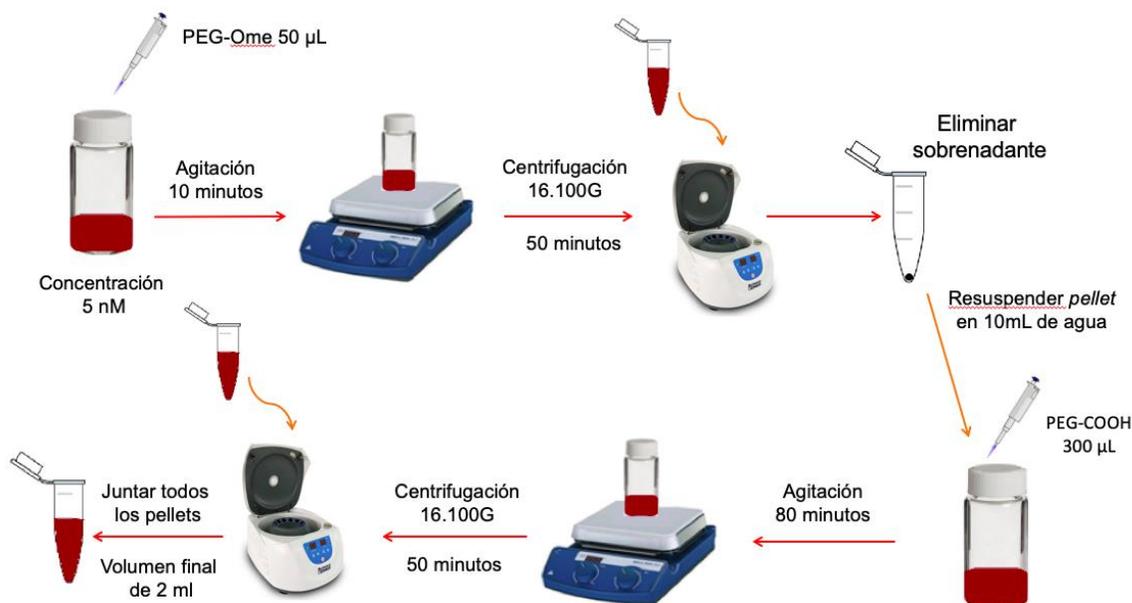


Fig. 3.2.1 Esquema de conjugación de AuN's con SH-PEG5000-OMet y SH-PEG5000-COOH

La conjugación de las AuN's con PEG (Fig. 3.2.1) se realizó depositando $4,5 \text{ mL}$ de AuN's en un vial, al cual se le adicionaron $6,5 \text{ mL}$ de una solución de citrato de sodio $1,2 \text{ mM}$, logrando una concentración final de AuN's cercana a 5 mM . Paralelamente, se pesaron $0,5 \text{ mg}$ de SH-PEG5000-OMe (JenKem Technology) y $1,75 \text{ mg}$ de SH-PEG5000-COOH (JenKem Technology), que fueron disueltos en 100 y $350 \mu\text{L}$ de agua Milli-Q respectivamente[36].

Bajo agitación constante, primero fueron agregados $50 \mu\text{L}$ de la solución SH-PEG5000-OMe y se dejó reaccionar por 10 minutos . Luego se alicuotaron en 10 tubos *ependorf* (1 mL por tubo) y fueron centrifugados a 16.200 RCF por 50 minutos . Posterior a eso, se tomaron los *pellets* y se resuspendieron en 10 mL de agua Milli-Q, al que se le adicionaron $300 \mu\text{L}$ de la solución de HS-PEG5000-COOH, y se dejó reaccionar por 60 minutos , se alicuotaron en 10 tubos *ependorf* (1 mL por tubo) y centrifugados a 16.200 RCF por 50 minutos . Se recuperaron los pellets y fueron resuspendidos en 2 mL de buffer MES $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH } 5,5$.

3.2.2 Conjugación AuN's con ácido fólico

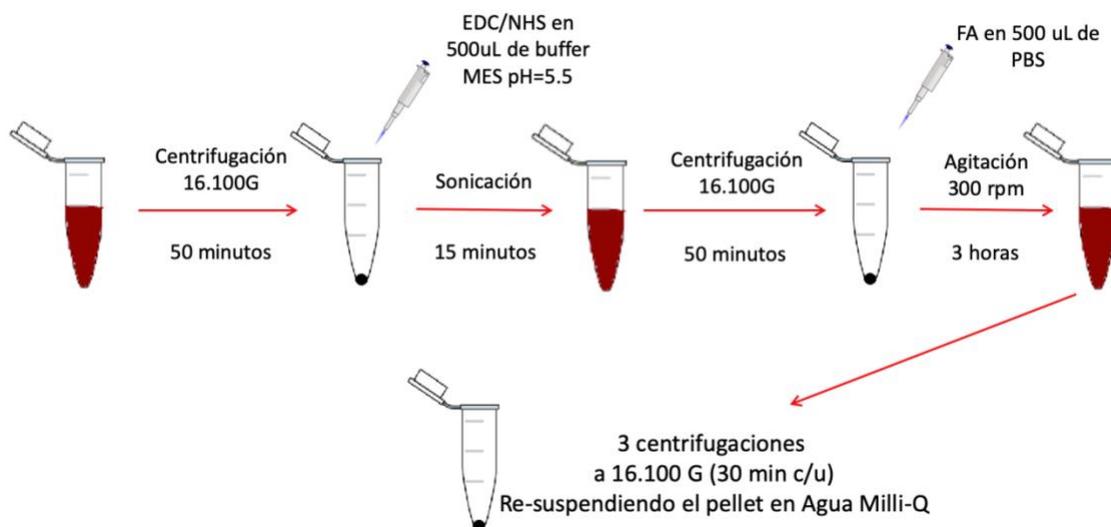


Fig. 3.2.2 Esquema de conjugación de AuN's con ácido fólico

Para la conjugación de las AuN's con ácido fólico se tomaron 20 mL de las AuN-PEG (Fig. 3.2.2) obtenidas anteriormente y se centrifugaron a 16.100 G durante 50 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en buffer fosfato y se mantuvo bajo agitación constante. Paralelamente, se masaron 2,5 mg de EDC y 6,25 mg de NHS, los cuales fueron disueltos en 250 μ L de buffer MES 0,1M. La solución resultante se agregó al *pellet* de AuN-PEG-COOH/OMe para activar el grupo COOH (Fig. 3.2.3) y se dejó interactuar durante 15 min. La mezcla se centrifugó a 16.100 G durante 60 minutos para retirar el exceso de EDC/NHS. Posteriormente, se agregó al pellet 1 mg de folato disuelto en 100 μ L de PBS y se dejó interactuar durante 3 horas. Finalmente, las AuN-PEG-FA resultantes fueron centrifugadas a 16.100 G durante 60 min (3 veces) para eliminar el folato no unido.

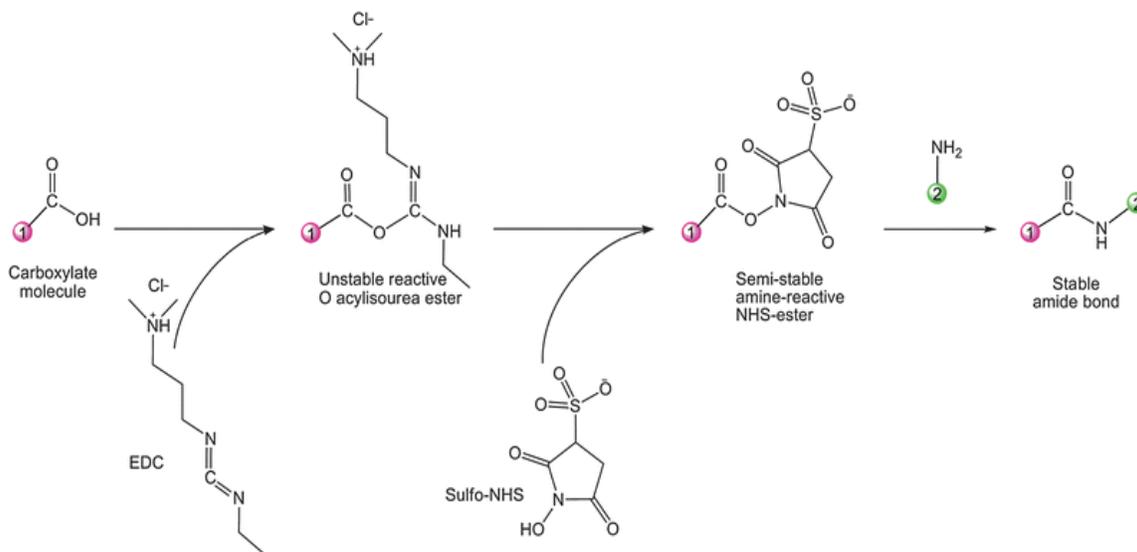


Fig. 3.2.3 Esquema de la reacción de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS).

3.3 Caracterización de nanopartículas de oro (AuN's) y sus conjugados AuN-PEG, AuN-PEG-FA

Para la caracterización de los nanosistemas se utilizaron las técnicas de espectrofotometría UV-visible, DLS y microscopia STEM que serán detalladas a continuación:

3.3.1 Espectrofotometría UV-visible (UV-vis)

Esta técnica se utilizó con la finalidad de observar la banda correspondiente al plasmón característico de las AuN's. Se tomó una alícuota de 100 μL de la solución de AuN's y se llevó a 1000 μL en una cubeta plástica de 1 cm y se analizó en el espectrofotómetro de doble haz, Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV, en el rango de longitud de onda de 400 a 700 nm, utilizando como blanco agua Mili-Q. De igual forma, para las AuN's conjugadas con HS-PEG y HS-PEG-FA, se tomó una alícuota de 100 μL de solución y se llevó a 1000 μL en una cubeta plástica de 1 cm, utilizando agua Milli-Q como blanco.

3.3.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Se determinó el diámetro hidrodinámico e índice de polidispersión por dispersión dinámica de la luz (DLS), utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern) que opera a una longitud de onda de fuente de luz de 633 nm y un ángulo de dispersión fijo de 173°. Se colocaron 100 μL de solución HS-PEG y HS-PEG-FA (en cubetas separadas) y se completaron a un volumen de 500 μL en cubetas de camino óptico de 1 cm. Cada muestra se midió un mínimo de 3 veces por cada una. Los resultados de las mediciones se expresan en términos diámetro hidrodinámico ($D_h \pm SD$) e índice de polidispersión (Pdi).

Se determinó el potencial zeta (indicativo de la carga superficial del nanosistema) de las AuN's, AuN-PEG y AuN-PEG-FA, utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern). Se prepararon soluciones diluidas de AuN's, AuN-PEG y AuN-PEG-FA (100 μL AuN's/AuN-PEG/AuN-PEG-FA + 900 μL de agua Mili-Q), se tomaron alícuotas de 900 μL de cada solución (por separado), y fueron cargadas en celdas DTS1070, realizando un mínimo de 3 mediciones por muestra. Los resultados se expresan en términos de potencial zeta ($mV \pm SD$).

3.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (modo STEM)

Con la finalidad de confirmar la morfología y tamaño de las nanopartículas se realizaron observaciones de microscopía electrónica de barrido con módulo de transmisión. Para realizar esta caracterización se depositó una gota de 20 μL del nanoconjugado sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con el polímero *formvar*. Se realizaron 2 lavados con agua milli-Q. Posterior a esto, se agregó ácido fosfotúngstico al 1% para teñir toda la materia orgánica que rodea a la nanopartícula producto de la funcionalización. A continuación, se retiró el exceso de ácido fosfotúngstico y se dejaron secar las rejillas toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las muestras se observaron al microscopio FEI Inspect 50 empleando una aceleración de los electrones desde 20kV utilizando el modo STEM. Finalmente, se midieron 100 partículas en las micografías obtenidas empleando el programa ImageJ, posteriormente estos datos se representaron como histogramas de tamaño como Frecuencia Relativa (%FR) vs diámetro.

3.4 Determinación de la concentración óptima de AuN's

Para determinar una concentración apropiada de AuN-PEG-FA (para su posterior cultivo en células B16F10) se realizó una curva de calibración (por triplicado) para determinar la sensibilidad del equipo. Se prepararon concentraciones de 2,3,4,5,6 y 12 nM de AuN's, utilizando agua Milli-Q como medio dispersante. Se alicuotaron en tubos *ependorf* y se introdujeron en el equipo de microtomografía computarizada (Micro-CT) SkyScan 1278 de la marca Bruker para obtener una reconstrucción en 3D.

3.5 Cuantificación *in-vitro* de células B16F10 cargadas con AuN-PEG-FA

Para la cuantificación de células B16F10, éstas fueron incubadas en 5 mL de medio RPMI (10%SFB y 1% PS) en una placa de 25 cc. Luego de 24 Horas se les retiró el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS, se utilizó tripsina 1X para soltar las células de la placa. Se inactivó la tripsina utilizando medio de cultivo RPMI, luego se retiró todo el contenido de la placa y se traspasó a un tubo Falcon de 15mL. Se centrifugó por 4 min a 4000G, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de medio de cultivo RPMI. Se tomaron 2 alícuotas, una para ser incubada con el nanosistema y otra para preparar el control, estimando que la cantidad final de células después de 24 horas fuera de alrededor de 6 millones de células. Esta alícuota fue cultivada con una concentración de 4nM de AuN-PEG-FA. Luego de 24 horas, se utilizó tripsina 1X por un corto período de tiempo para liberar las células desde su matriz. Se contaron utilizando la cámara de Neubauer, usando azul de tripan como colorante para evaluar indirectamente viabilidad celular. Luego se colocaron en paraformaldehído (PF) al 4% a 4°C. Se centrifugaron y fueron resuspendidas en PBS. Finalmente, se prepararon diluciones de 100.000, 50.000, 25.000, 10.000, 5000 células en tubos *ependorf* de 0,6 ml. Luego, estos se introdujeron en el equipo de microtomografía computarizada (Micro-CT) SkyScan 1278 de la marca Bruker para obtener una reconstrucción en 3D. Al igual que en la determinación de la concentración óptima, se hicieron tubos control

con agua Milli-Q y células resuspendidas en agua milli-Q, para esta última, se utilizó una cantidad de 100.000 células no tratadas con nanopartículas, estas células recibieron el mismo tratamiento que las células que fueron incubadas con el nanosistema AuN-PEG-FA. Para la cuantificación de volumen, se utilizó el CTan que entrega el volumen en mm³.

4. Resultados y Discusión

4.1 Síntesis y caracterización nanopartículas de oro funcionalizadas con folato (AuN-PEG-FA).

Una vez obtenidas las nanopartículas se caracterizaron por espectrofotometría UV-Vis. Como es posible observar en la figura 4.1 la solución de AuN's muestra su plasmón característico[32] en la zona de los 519-521 nm (519 nm específicamente) confirmando así la presencia de nanopartículas de oro con un tamaño de entre 10-20 nm. Al conjugar con PEG (formando el complejo AuN-PEG) el plasmón característico se desplazó hacia la derecha debido a la quimisorción del PEG a la superficie de la nanopartícula alcanzando un máximo de absorción a los 522nm[32, 36]. Mientras que al conjugar con el ácido fólico (formando el complejo AuN-PEG-FA) el plasmón se ve desplazado a 524 nm [56].

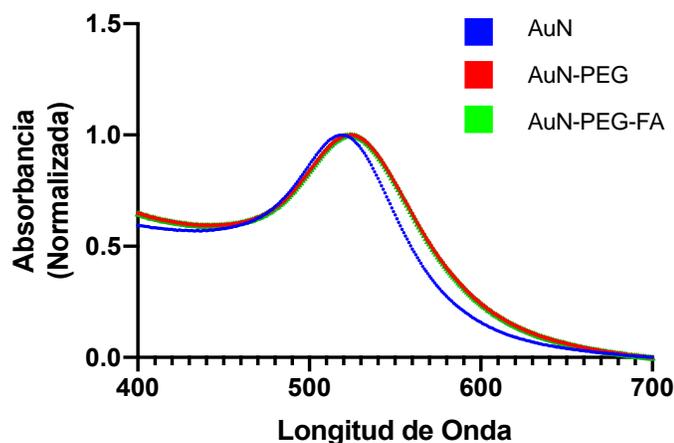


Figura 4.1 Espectros de absorción de las nanopartículas de oro sin funcionalizar y funcionalizadas

En segunda instancia, se midió el potencial zeta de las partículas sintetizadas con la finalidad de evaluar la carga superficial de los nanosistemas y analizar los cambios en su carga en los sucesivos pasos de funcionalización del nanosistema. Como resultado, se observa que todos los nanosistemas, exceptuando las AuN-PEG-FA, tienen valores de potencial zeta negativos (tabla 1). Esto se debe a que el citrato utilizado en el proceso de síntesis se adsorbe sobre la superficie de la nanopartícula (AuN) y la estabiliza, contrarrestando las cargas superficiales positivas de algunos átomos de oro (con carga positiva) presentes y dejando finalmente a estas partículas con carga negativa [57]. Cuando conjugamos el nanosistema con PEG-OMe y PEG-COOH (AuN-PEG-COOH/OMe) vemos un cambio en el pZ del nanosistema debido a que se está desplazando el citrato y se están adsorbiendo las moléculas de HS-PEG-COOH. La carga se acerca más hacia la neutralidad en comparación al sistema con citrato, pero continúa siendo negativa debido al PEG-COOH, el cual al pH (7) de la medición presenta carga negativa.

Nanosistema	Dh (nm) \pm SD	Pdi	pZ (mV) \pm SD
AuN's	19 \pm 1	0,24	-19 \pm 1
AuN-PEG-COOH/OMe	28 \pm 1	0,26	-8 \pm 1
AuN-PEG-FA	34 \pm 3	0,32	4 \pm 3

Tabla 1. Dh y pZ en las diferentes etapas de funcionalización de las nanopartículas. Las medidas se hicieron a pH=7

A medida que se van funcionalizando las nanopartículas, su diámetro hidrodinámico aumenta lo que se relaciona con las etapas de funcionalización.

Finalmente, al funcionalizar con ácido fólico (FA) el complejo toma un valor de potencial Z positivo, alcanzando su tamaño hidrodinámico máximo final y una estabilidad en medio mucho mayor que las nanopartículas sin funcionalizar. El valor positivo del potencial Z final podría atribuirse a que el ácido fólico posee 2 grupos carboxilos, de los cuales 1 de ellos (Fig. 4.1.1, Carboxilo A) se encuentra desprotonado a pH 7, confiriendo así a la nanopartícula sólo de 1 carga negativa.

La adición de distintos PEG's cumple con la finalidad de aumentar su estabilidad, debido al impedimento estérico que producen las largas cadenas de PEG's y

también por la repulsión eléctrica propias de las nanopartículas. Asimismo, los PEG's aumentan la biocompatibilidad debido a que reducen las interacciones de las nanopartículas con las proteínas del plasma reduciendo así la captación por macrófagos y la subsecuente retención en órganos del sistema reticuloendotelial [36].

Cabe destacar que las AuN's se encuentran en citrato, y su estabilidad está dada principalmente por la repulsión eléctrica que se produce entre las mismas partículas por su carga superficial. Por otra parte, el HS-PEG-OMe no posee carga formal, mientras que el HS-PEG-COOH solo tiene una carga formal. Por lo tanto, al conjugar las AuN's con los distintos PEG's se logra una disminución de la carga superficial debido al desplazamiento del citrato el cual tiene tres cargas negativas.

Con respecto al diámetro hidrodinámico, este es mayor que el diámetro observado por STEM, debido a la presencia de la capa de hidratación y la presencia de iones adheridos a la superficie de la nanopartícula. Por esto es que al adicionar PEG, aumentan las interacciones de la nanopartícula con el medio, aumentando así el diámetro hidrodinámico.

La unión del nanosistema AuN-PEG al ácido fólico se realiza por el terminal amino del ácido fólico y el terminal carboxilo del nanosistema.

Se ha reportado que la unión del ácido fólico a la nanopartícula debe realizarse por el terminal carboxilo de este, debido a que el terminal amino participa en el reconociendo de la molécula por parte del receptor FOLR1 [58].

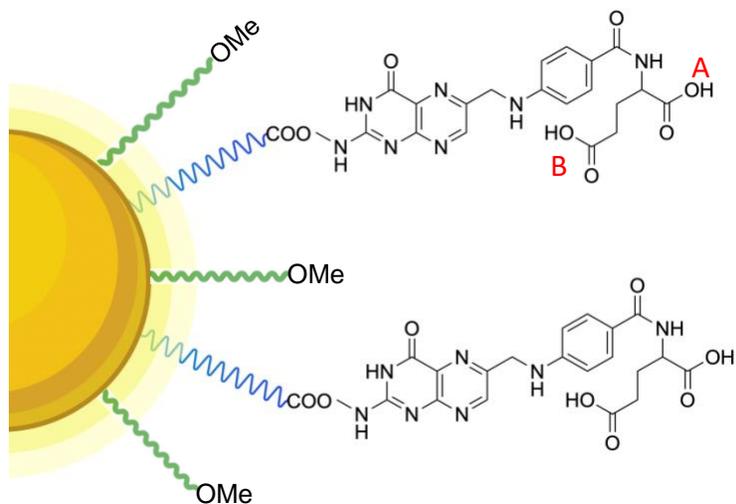


Fig. 4.1.1 Nanosistema AuN-PEG-

Pese a que en este trabajo se realizó la conjugación a través del amino terminal, no se impidió el reconocimiento del nanosistema AuN-PEG-FA (Fig. 4.1.1) por parte del receptor FOLR1, esto puede ser debido a que la unión por el amino terminal no disminuye completamente la interacción de este con el receptor [58]. Al igual, los dos grupos carboxilos del ácido fólico interaccionan con el receptor FOLR1, compensando así la utilización del amino terminal como punto de unión, permitiendo que la nanopartícula ingrese junto al ácido fólico.

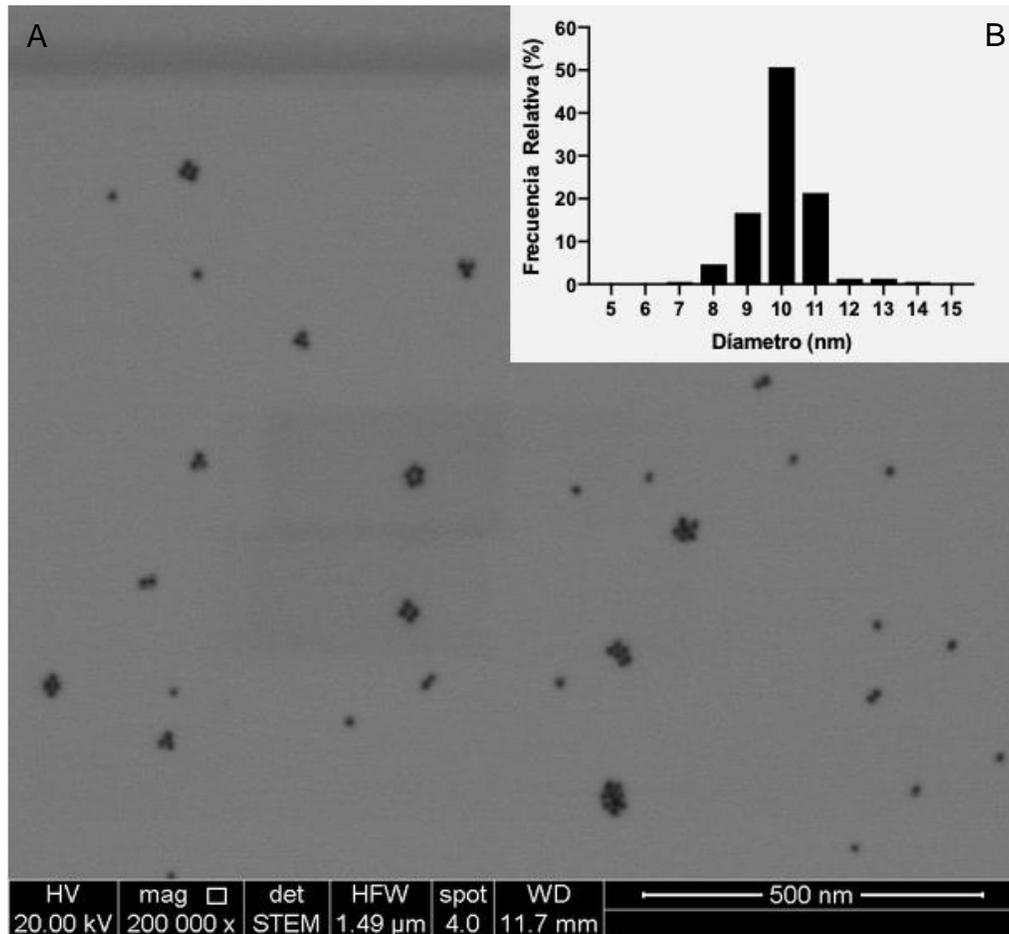


Figura 4.1.2 Imagen obtenida por Microscopia electrónica (STEM) del nanosistema AuN-PEG-FA (A); Histograma de la Frecuencia relativa vs diámetro del nanosistema AuN-PEG-FA (B). Para el histograma se contabilizaron 150 nanopartículas.

Finalmente para confirmar la morfología y tamaño de las nanopartículas se realizó microscopia electrónica de barrido con módulo de transmisión. Como se indica en los histogramas de tamaño, el diámetro promedio del nanosistema final es de 10 nm (Fig 4.1.2). Cabe destacar que los tamaños observados por STEM son menores que los obtenidos por DLS (Tabla 3). Esto se debe a que el DS determina el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula el cual considera la capa de hidratación y los iones adheridos a la superficie de la nanopartícula. En relación a la morfología y la dispersión de los nanosistemas, se pudo observar que poseen la misma forma una población de tamaños homogénea entre las partículas, lo cual concuerda con lo observado por DLS (Tabla 3).

4.2 Determinación de la concentración óptima de AuN's

Mediante una reconstrucción en 3D (Anexo I) se determinó cuál era la concentración óptima de nanopartículas a utilizar en los ensayos *in vitro*. Para esta determinación se utilizó como control un tubo que solo contenía agua Milli-Q. Todos los tubos examinados contenían un volumen de 200 μL de suspensión de AuN's, esto quiere decir que el máximo volumen que se puede detectar utilizando esta técnica es de 200 μL de AuN's.

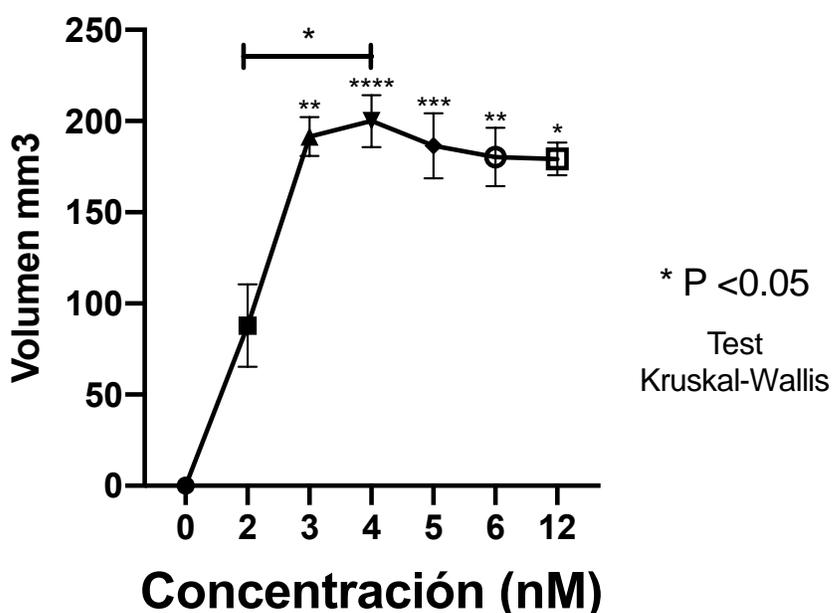


Fig. 4.2.4 Gráfico de Concentración de nanopartículas v/s volumen

Del gráfico (Fig. 4.2.4) es posible interpretar que la concentración mínima óptima para detectar el volumen completo de 200 μL de AuN's es la concentración de 4 nM, la cual tiene una diferencia significativa ($P < 0.0001$) con respecto al control. La concentración de 2 nM presenta mucha variación en los resultados, esto puede ser debido a que al estar tan diluidas las nanopartículas estas presentan un mayor grado de movimiento dentro de la suspensión, haciendo que la atenuación de rayos X sea irregular y poco eficiente. No existen diferencias significativas a concentraciones mayores a 4 nM, por lo tanto, estadísticamente no hay diferencia

de detección de volumen a concentraciones mayores, es decir, a partir de 4nM en adelante el equipo es capaz de detectar el volumen completo al interior del tubo.

Es posible apreciar un pequeño descenso en la curva a partir de 4nM, el cual puede atribuírsele a errores de manipulación de la muestra al preparar las soluciones o pérdida de volumen por evaporación al momento de ingresar las muestras dentro del equipo.

4.3 Cuantificación *in-vitro* de células B16F10 cargadas con AuN-PEG-FA

Para la cuantificación de células utilizando la cámara de Neubauer se utilizó el colorante azul de tripán, el cual permite diferenciar células vivas de las muertas bajo el principio de permeabilidad de la membrana celular, es decir, que el azul de tripán no atraviesa la membrana de las células vivas mientras que las células muertas se tiñen de forma completa. En nuestro caso se agregó el azul de tripán y se visualizó mediante microscopio la tinción, tiñéndose solo de forma externa, manteniendo un centro blanco, indicando que las células se encuentran viables. Se contabilizaron promediando por cuadrante alrededor de 1200 células, lo cual indica que la concentración final de células sacadas de cultivo es de alrededor de 6 millones de células por mL. Para células control se realizó el mismo procedimiento, al igual que las células cultivadas con el nanosistema, mostraron un halo azul y un centro blanco, indicando que las células son viables. Se contaron de la misma forma promediando aproximadamente 400 células por cuadrante, lo cual indica que la concentración final de células sacadas de cultivo es de aproximadamente 2 millones de células por mL.

Mediante la reconstrucción en 3D (Anexo II), se logró determinar cuál era la mínima cantidad de células detectables por el equipo. Al igual que en la determinación de la concentración óptima, se hicieron tubos blancos con agua milli-Q y células resuspendidas en agua milli-Q. Para el tubo control con células, se utilizó una cantidad de 100.000 células no tratadas con nanopartículas.

Para diferenciar con mayor claridad las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA por sobre el resto de los elementos, se le asignó el color rojo (Anexo II, Fig. 2) al contraste producido por las nanopartículas y el color azul a todo el resto de los elementos a excepción de la espuma, para no entorpecer el análisis de la imagen.

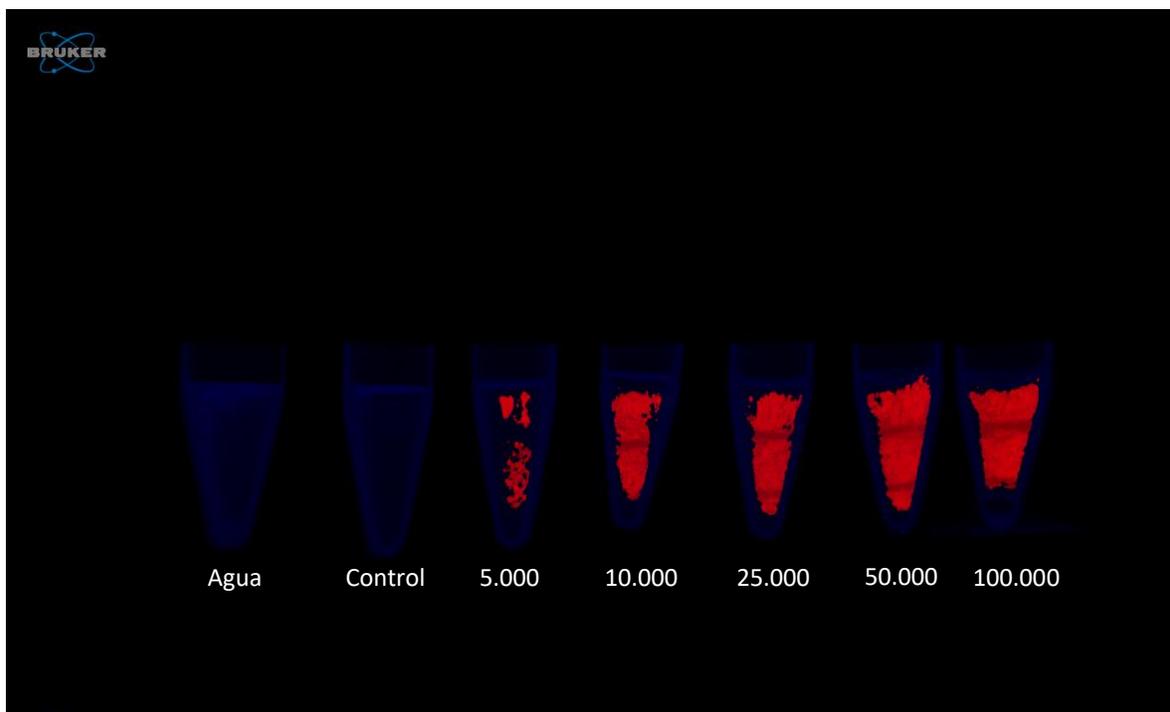


Figura 4.3 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA (en rojo).

Al tener nuestro nanosistema B16F10-AuN-PEG-FA coloreado es posible realizar la medición de volumen utilizando el programa CTan.

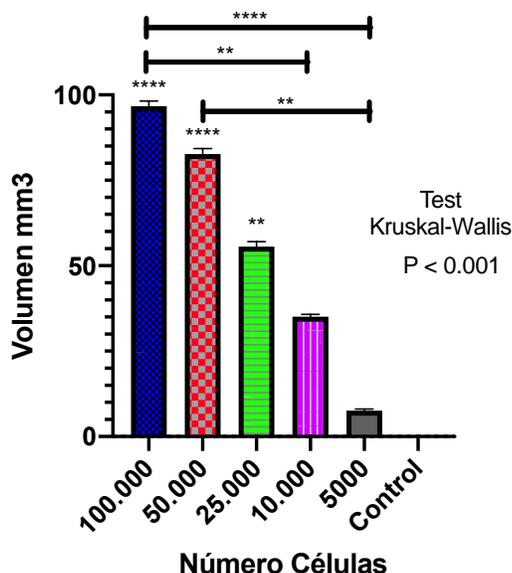


Figura 4.3.5 Gráfico de Número de células cargadas con nanosistema AuN-PEG-FA vs Volumen detectado

Las concentraciones celulares de 100.000 y 50.000 tuvieron diferencias significativas ($P < 0,0001$) con respecto al control. Finalmente, la concentración de 25.000 células es la concentración de células más baja detectable por el equipo, con una diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.001$).

Esta cantidad de células detectadas por esta técnica correspondería a la cantidad de células que habría en un tumor de 0,25mm de diámetro [16]. Cabe destacar que el equipo utilizado para la medición no es el más sensible, ni el de mejor resolución, sin embargo, mediante la utilización de nanopartículas de oro (AuN-PEG-FA) fue posible obtener mejores resultados que con un equipo que tiene el doble de resolución y que utiliza el doble de potencia para la obtención de imágenes [15].

Se espera que el uso de esta técnica en ensayos *in vivo* tenga buenos resultados, ya que existe evidencia científica que respalda la capacidad que tienen los equipos de micro-CT de detectar células previamente cargadas con nanopartículas [34]. No es posible extrapolar los resultados obtenidos de manera *in vitro* en este trabajo a un sistema *in vivo* debido a las condiciones y variables que tiene este último (distribución, metabolismo y excreción de las nanopartículas) como así también disposición de las células tumorales en el mismo tumor.

5. Conclusiones y Perspectivas

- A partir de los resultados entregados por el espectrofotómetro UV-Vis y el DLS, se puede concluir que fue posible sintetizar y caracterizar de manera exitosa las nanopartículas y sus distintas funcionalizaciones posteriores, logrando un nanosistema (AuN-PEG-FA) estable que es posible utilizar en experimentos *in vitro*.
- Fue posible determinar con éxito cuál es la concentración mínima de nanopartículas detectables, utilizando el equipo de micro-CT, la que corresponde a 4nM. Lo que posibilita detectar el volumen completo de la suspensión, no existiendo diferencias significativas en la detección de volumen, con respecto con concentraciones mayores.
- Fue posible detectar con éxito de manera ultrasensible una cantidad mínima de células utilizando el equipo micro-CT, la cual es de 25.000 células, lo que corresponde a un tumor de aproximadamente 0,25mm.
- En trabajos posteriores se espera estudiar de manera *ex vivo* e *in vivo* la cantidad mínima de células que es posible detectar de manera ultrasensible utilizando un equipo de micro-CT.

Referencias

1. Garcia-Bennett, A., M. Nees, and B. Fadeel, *In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy*. *Biochemical Pharmacology*, 2011. **81**(8): p. 976-984.
2. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
3. Cancer, I.A.f.R.o. *GLOBOCAN 2018*. 2019 09/12/2018; Available from: <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018#>.
4. Jimenez de la Jara, J., et al., *A snapshot of cancer in Chile: analytical frameworks for developing a cancer policy*. *Biol Res*, 2015. **48**: p. 10.
5. Goss, P.E., et al., *Planning cancer control in Latin America and the Caribbean*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(5): p. 391-436.
6. Departamento de Manejo Integral del Cáncer y otros Tumores, M.d.S., *Plan nacional del Cáncer 2018-2028*. 2018.
7. Solís C, J., et al., *CANCER CÉRVICO UTERINO ESTADIO IIIB TRATADO CON RADIOQUIMIOTERAPIA CONCOMITANTE BASADA EN CISPLATINO: EXPERIENCIA INICIAL HOSPITAL CARLOS VAN BUREN*. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 2007. **72**: p. 11-19.
8. Bhatnagar, P., et al., *Imaging of genetically engineered T cells by PET using gold nanoparticles complexed to Copper-64*. *Integr Biol (Camb)*, 2013. **5**(1): p. 231-8.
9. Han, X., et al., *Applications of nanoparticles in biomedical imaging*. *Nanoscale*, 2019. **11**(3): p. 799-819.
10. Bettio, A., et al., *Synthesis and Preclinical Evaluation of a Folic Acid Derivative Labeled with ¹⁸F for PET Imaging of Folate Receptor-Positive Tumors*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2006. **47**(7): p. 1153-1160.
11. Nam, S.Y., et al., *In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37267.
12. Yu, S.B. and A.D. Watson, *Metal-Based X-ray Contrast Media*. *Chem Rev*, 1999. **99**(9): p. 2353-78.
13. Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. *Chem Soc Rev*, 2009. **38**(6): p. 1759-82.
14. Lusic, H. and M.W. Grinstaff, *X-ray-Computed Tomography Contrast Agents*. *Chemical Reviews*, 2013. **113**(3): p. 1641-1666.
15. Deng, L., et al., *Early Lung Adenocarcinoma in Mice: Micro-Computed Tomography Manifestations and Correlation with Pathology*. *Translational oncology*, 2017. **10**(3): p. 311-317.
16. Narod, S.A., *Disappearing breast cancers*. *Current Oncology*, 2012. **19**(2): p. 2.
17. Wilson, J.R., et al., *Noninvasive Cardiac Imaging: Cardiac Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier.
18. Mohammed, N.M.A., et al., *Contrast-induced Nephropathy*. *Heart views : the official journal of the Gulf Heart Association*, 2013. **14**(3): p. 106-116.
19. Guerrero, A.R., et al., *Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release*. *Nanomedicine (Lond)*, 2014. **9**(13): p. 2023-39.

20. Sharma, H., et al., *Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer*. Drug Discov Today, 2015. **20**(9): p. 1143-51.
21. Prades, R., et al., *Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor*. Biomaterials, 2012. **33**(29): p. 7194-205.
22. Cho, E.C., Q. Zhang, and Y. Xia, *The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles*. Nat Nanotechnol, 2011. **6**(6): p. 385-91.
23. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 662-8.
24. Chithrani, B.D., et al., *Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells*. Nanomedicine, 2009. **5**(2): p. 118-27.
25. Khan, M.S., G.D. Vishakante, and H. Siddaramaiah, *Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications*. Adv Colloid Interface Sci, 2013. **199-200**: p. 44-58.
26. Bao, C., et al., *A promising road with challenges: where are gold nanoparticles in translational research?* Nanomedicine (Lond), 2014. **9**(15): p. 2353-70.
27. Liu, Y., et al., *Human Induced Pluripotent Stem Cells for Tumor Targeted Delivery of Gold Nanorods and Enhanced Photothermal Therapy*. ACS Nano, 2016. **10**(2): p. 2375-85.
28. Xu, C., G.A. Tung, and S. Sun, *Size and Concentration Effect of Gold Nanoparticles on X-ray Attenuation As Measured on Computed Tomography*. Chem Mater, 2008. **20**(13): p. 4167-4169.
29. Wang, H., et al., *Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(11): p. 2979-2988.
30. Kim, T., et al., *In Vivo Micro-CT Imaging of Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Gold-Poly-L-Lysine Nanocomplexes*. Advanced Functional Materials, 2017. **27**(3): p. 1604213.
31. Menk, R.H., et al., *Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(5): p. 647-654.
32. Guerrero, S., et al., *Gold nanoparticles as tracking devices to shed light on the role of caveolin-1 in early stages of melanoma metastasis*. Nanomedicine, 2018. **13**(12): p. 1447-1462.
33. Lopez-Chaves, C., et al., *Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies*. Nanomedicine, 2018. **14**(1): p. 1-12.
34. Meir, R., et al., *Design principles for noninvasive, longitudinal and quantitative cell tracking with nanoparticle-based CT imaging*. Nanomedicine, 2017. **13**(2): p. 421-429.
35. Yeh, Y.-C., B. Creran, and V.M. Rotello, *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*. Nanoscale, 2012. **4**(6): p. 1871-1880.
36. Huang, X., et al., *A Reexamination of Active and Passive Tumor Targeting by Using Rod-Shaped Gold Nanocrystals and Covalently Conjugated Peptide Ligands*. ACS Nano, 2010. **4**(10): p. 5887-5896.
37. Arnida, A. Malugin, and H. Ghandehari, *Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres*. Journal of Applied Toxicology, 2010. **30**(3): p. 212-217.
38. Cartiera, M.S., et al., *The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells*. Biomaterials, 2009. **30**(14): p. 2790-2798.

39. Bahrami, B., et al., *Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy*. *Tumor Biology*, 2015. **36**(8): p. 5727-5742.
40. Zhong, Y., et al., *Ligand-Directed Active Tumor-Targeting Polymeric Nanoparticles for Cancer Chemotherapy*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(6): p. 1955-1969.
41. Zwicke, G.L., G.A. Mansoori, and C.J. Jeffery, *Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics*. *Nano reviews*, 2012. **3**: p. 10.3402/nano.v3i0.18496.
42. Muller, C. and R. Schibli, *Folic acid conjugates for nuclear imaging of folate receptor-positive cancer*. *J Nucl Med*, 2011. **52**(1): p. 1-4.
43. Berger, S.H., D.L. Pittman, and M.D. Wyatt, *Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(6): p. 697-706.
44. Xu, X. and J. Chen, *One-carbon metabolism and breast cancer: an epidemiological perspective*. *J Genet Genomics*, 2009. **36**(4): p. 203-14.
45. Kennedy, D.A., et al., *Folate intake and the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Cancer Epidemiol*, 2011. **35**(1): p. 2-10.
46. Collin, S.M., et al., *Circulating folate, vitamin B12, homocysteine, vitamin B12 transport proteins, and risk of prostate cancer: a case-control study, systematic review, and meta-analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(6): p. 1632-42.
47. Duthie, S.J., *Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis*. *J Inherit Metab Dis*, 2011. **34**(1): p. 101-9.
48. Parker, N., et al., *Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay*. *Analytical Biochemistry*, 2005. **338**(2): p. 284-293.
49. Sánchez-del-Campo, L., et al., *The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate*. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009. **22**(5): p. 588-600.
50. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. *Traffic*, 2002. **3**(5): p. 311-20.
51. Medina Consuegra, E.D., *Obtención de conjugados péptidos-nanopartículas metálicas para el desarrollo de una estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Tesis (Pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico)*. in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 2006., Universidad de Chile: Santiago, Chile.
52. Medina Consuegra, G.E., *Estudios preliminares de permeabilidad, estabilidad y toxicidad de nanopartículas metálicas conjugadas a péptidos. Tesis (Pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico)*. , in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 2006. , Universidad de Chile: Santiago, Chile. .
53. Levy, R., et al., *Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(32): p. 10076-84.
54. Turkevich, J., P.C. Stevensen, and J. Hillier, *Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold*. *Discuss Faraday Society*, 1951. **11**: p. 55-75.
55. Olmedo Alegria, I.O., *OBTENCIÓN DE CONJUGADOS DE PÉPTIDOS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS*, in *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*,. 2007, Universidad de Chile: Santiago, Chile.
56. Palma Florez, S., *Aislamiento de exosomas con nanopartículas de oro funcionalizadas obtenidos desde la línea celular B16F10*. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/170167>. 2017.

57. Li, G., et al., *Spherical and Planar Gold(0) Nanoparticles with a Rigid Gold(I)-Anion or a Fluid Gold(0)-Acetone Surface*. *Langmuir*, 2003. **19**(16): p. 6483-6491.
58. Chen, C., et al., *Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 486-489.

Anexo I

Determinación de la Concentración óptima de nanopartículas

Para la determinación de la concentración óptima de AuN's y para la cuantificación de células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA se realizó el siguiente análisis de los histogramas entregados por el equipo de micro-CT.

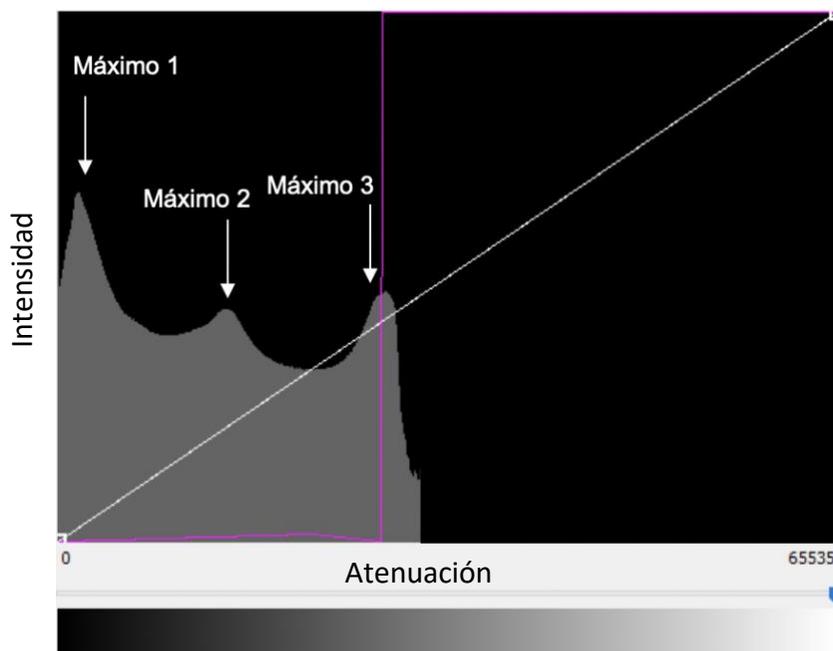


Fig. A1.1 Histograma con opacidad ajustada de la solución de nanopartículas

que haya dentro del equipo, es decir, los máximos son representativos de lo que analizó y no se visualiza un aumento de estos si agregó más muestra.

En este histograma (Fig. A1.1) es posible identificar 3 máximos característicos. El primero de ellos es el máximo de atenuación de la espuma que contiene los tubos, la cual tiene una baja atenuación para evitar interferencias con las reconstrucciones posteriores. El segundo máximo de atenuación característico es el del tubo *ependorf* que contiene las suspensiones. Finalmente, el tercer máximo de atenuación esta compartido entre el agua y las nanopartículas. Para poder diferenciar y aislar la señal de las nanopartículas por sobre el resto de los elementos dentro del análisis, es necesario ajustar la opacidad, que dentro del histograma se ve representada por la línea violeta.

El histograma (Fig. 4.2.1) nos entrega información sobre un aumento de la atenuación de rayos X a medida que nos desplazamos por el eje X hacia la derecha. Mientras que al desplazarnos por el eje Y aumentamos la intensidad. Cabe señalar que estos máximos no aumentan en función de la cantidad de muestra

Todo lo que esté bajo esta línea o a la derecha de ésta será visible, en este caso, estará en el rango de las 26.000 y 27.000 unidades de atenuación.

Al realizar todos los procedimientos anteriores, se obtiene una imagen (Fig. A1.2) donde se puede observar claramente (coloración gris) las nanopartículas en suspensión. Con la finalidad de mejorar el análisis, se le otorgó la coloración roja a las nanopartículas y la coloración azul a los tubos (Fig. A1.3)

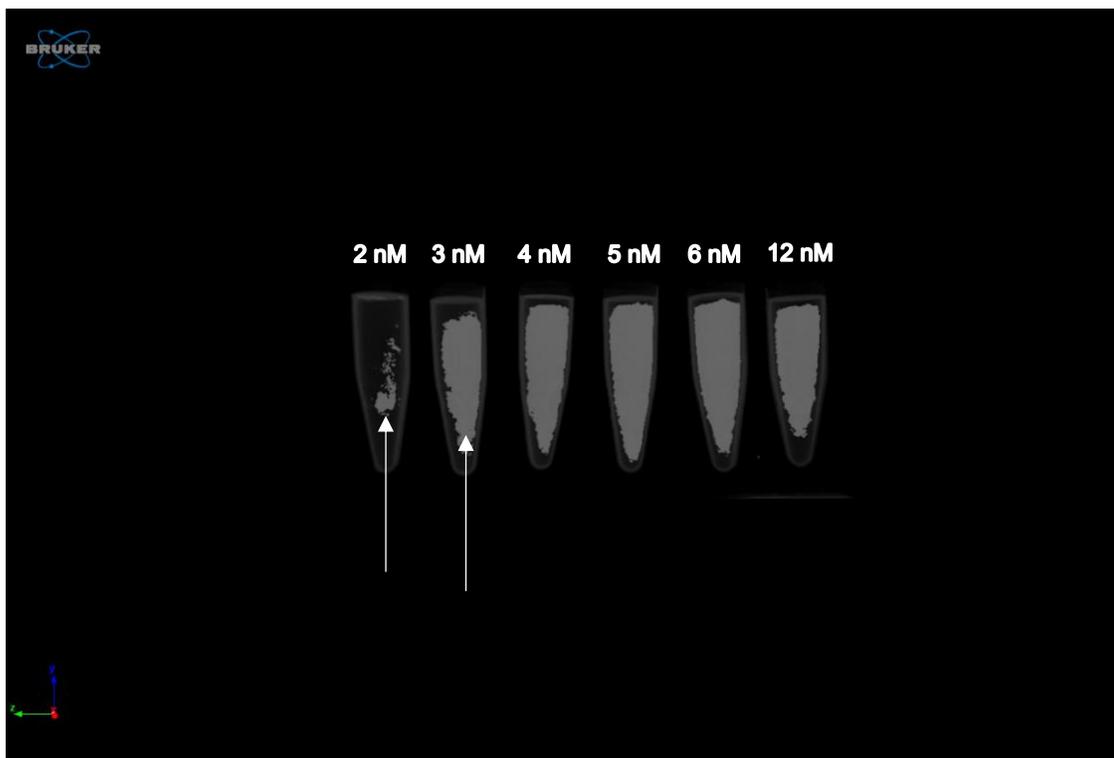


Fig. A1.2 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las nanopartículas.

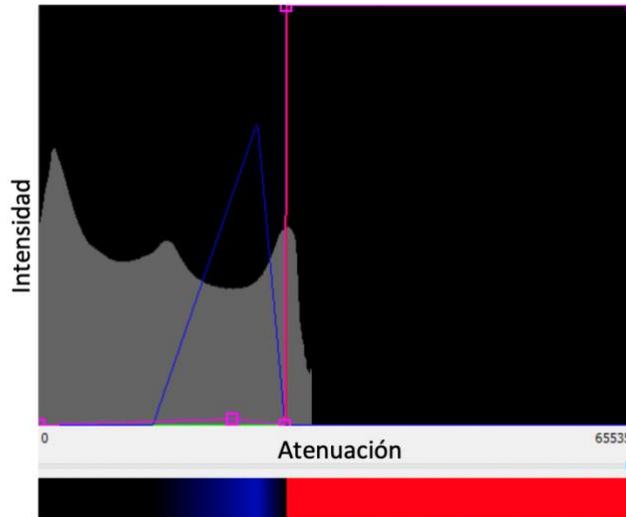


Fig. A1.3 Histograma con la opacidad ajustada, nanopartículas en color rojo y tubos en color azul.

En el histograma (Fig. A1.3) todo lo que esté bajo y a la derecha de la línea violeta será coloreado de color rojo, mientras que, hacia la izquierda, sólo la pequeña porción bajo la línea violeta será coloreada de azul (La línea verde que aparece en la parte inferior está configurada para no entregar coloración) proporcionando una imagen (Fig. A1.4) apta para el análisis de volumen utilizando el programa recomendado por el fabricante (CTan).

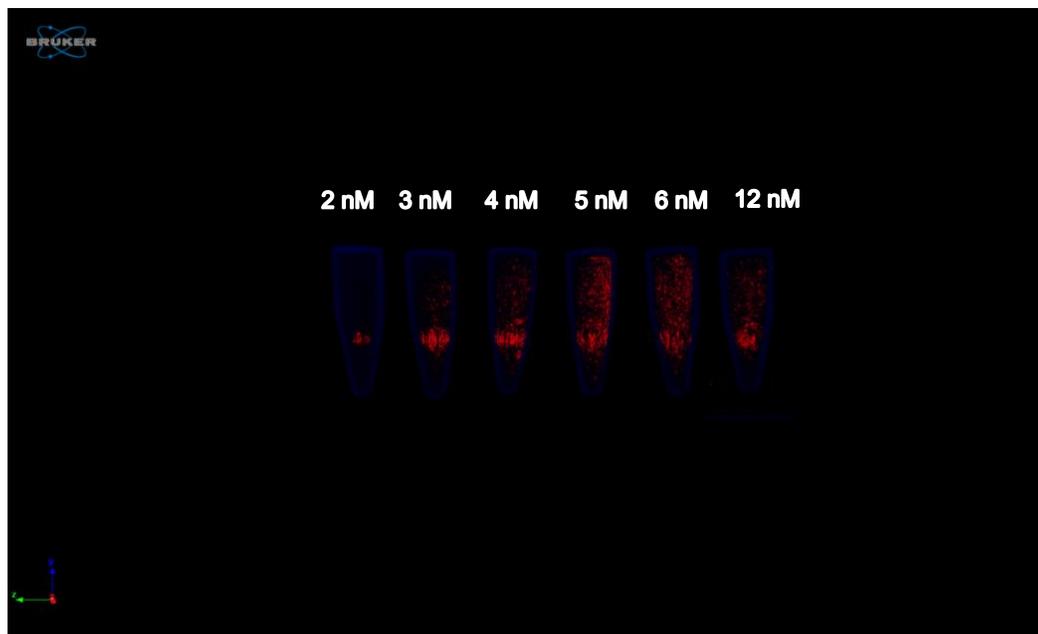


Fig. A1.4 Imagen con la opacidad ajustada, nanopartículas en color rojo y tubos en color azul.

Anexo II

Cuantificación *in-vitro* de células B16F10 cargadas con AuN-PEG-FA

Para la cuantificación de células se realizó el mismo procedimiento para analizar las imágenes. Para poder diferenciar y aislar la señal de las nanopartículas (Fig. A2.1) por sobre el resto de los elementos dentro del análisis, es necesario ajustar la opacidad, que dentro del histograma se ve representada por la línea violeta (Fig. A2.2). Todo lo que esté bajo esta línea o a la derecha de ésta será visible, en este caso, estará en el rango de las 26.000 y 27.000 unidades de atenuación.

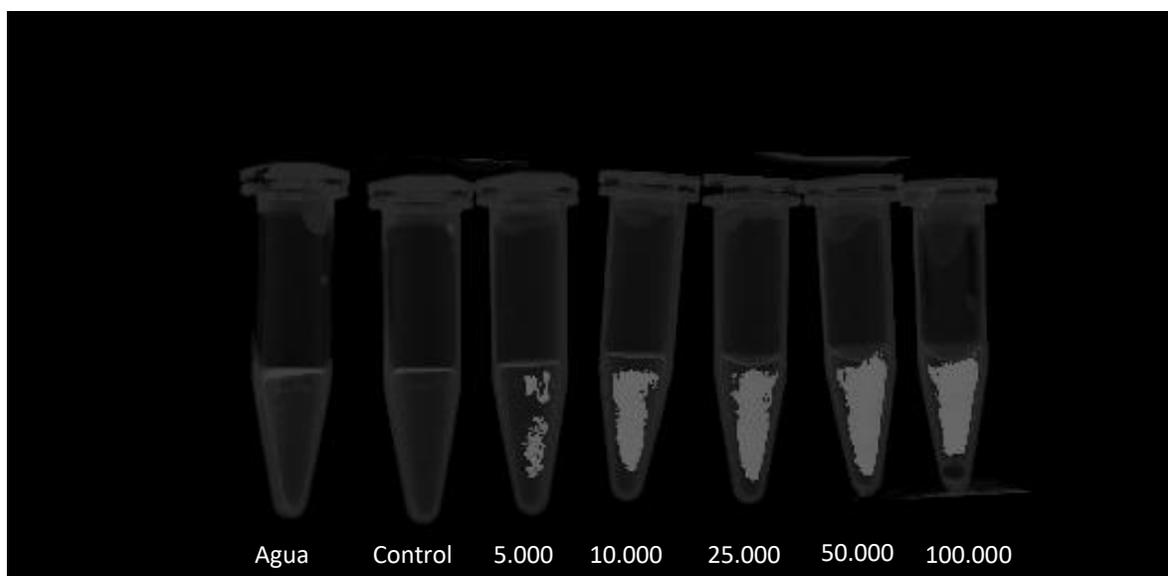


Fig. A2.1. Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA. Las células cargadas con el nanosistema aparecen en color gris

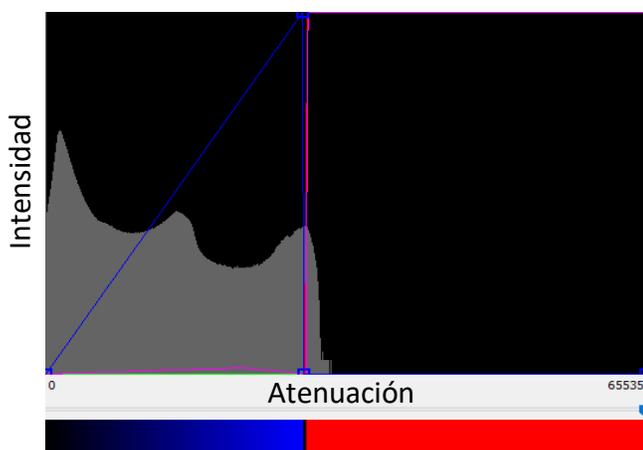


Fig. A2.2 Histograma con opacidad ajustada, células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA en rojo y tubos en color azul.

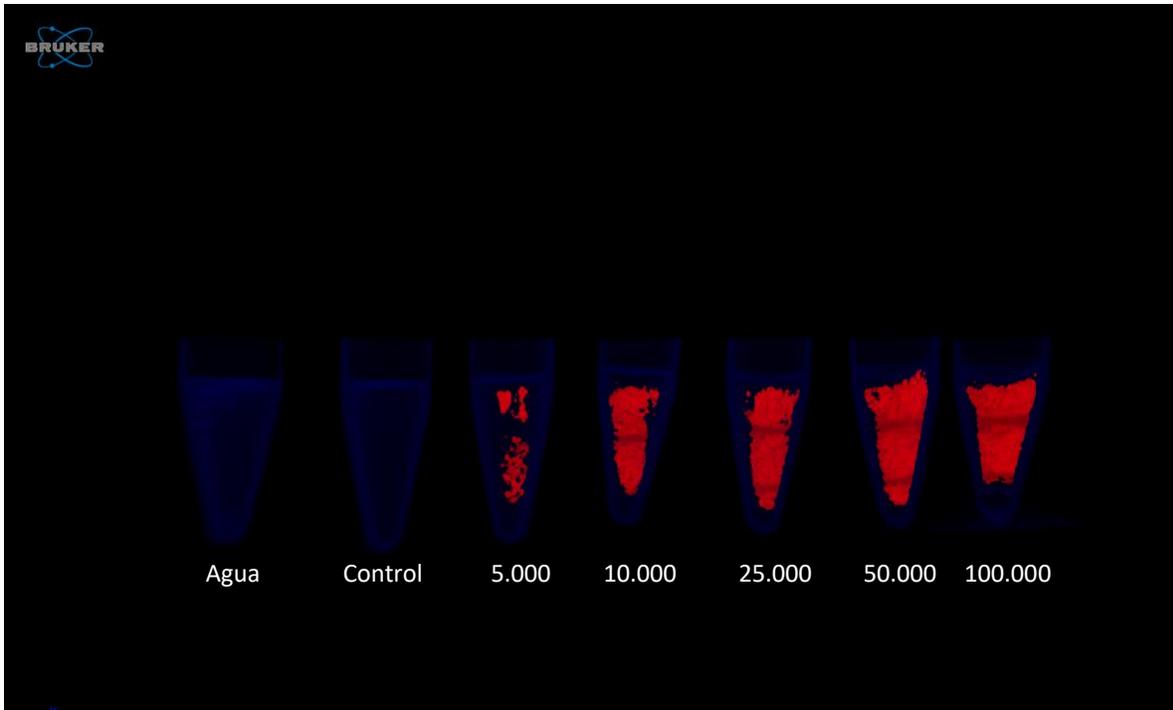


Fig. A2.3 Imagen con la opacidad ajustada para aislar la atenuación de las de las células cargadas con el nanosistema AuN-PEG-FA (en rojo).

Cabe señalar que, al fijar la opacidad en el rango anteriormente descrito, ni el agua ni el control con células no marcadas atenuaban rayos X (Fig. A2.1), por tanto, es posible apreciar que los controles no atenúan los rayos X, apareciendo los tubos vacíos (Fig. A2.1).

En el histograma (Fig. A2.2) todo lo que esté bajo y a la derecha de la línea violeta será coloreado de color rojo, mientras que, hacia la izquierda, sólo la pequeña porción bajo la línea violeta será de color azul (La línea verde que aparece en la parte inferior está configurada para no entregar coloración) proporcionando una imagen (Fig. A2.3) apta para el análisis de volumen utilizando el programa recomendado por el fabricante (CTan).