



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Síntesis y conjugación de nanopartículas de oro
para aplicaciones biomédicas**

Tesis que presenta

Clara de la Luz Carreón Álvarez

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la tesis:

Dr. Rubén López Revilla

Dr. José Luis Rodríguez López

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Síntesis y conjugación de nanopartículas de oro para aplicaciones biomédicas” presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Clara de la Luz Carreón Álvarez y aprobada el 02 del 03 de 2021 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
Codirector de la tesis

Dr. José Luis Rodríguez López
Codirector de la tesis

Dr. Sergio Casas Flores
Asesor interno

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Asesor externo

Dr. José Luis Sánchez García
Asesor externo

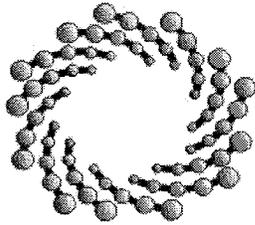


Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular y el Laboratorio de Propiedades de Nanopartículas Metálicas de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Rubén López Revilla y del Dr. José Luis Rodríguez López.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 634988) y otra del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado con el apoyo del proyecto: Diseño de un prototipo de biosensor para diagnóstico del virus del papiloma humano de alto riesgo, Proyectos de Desarrollo Científico para Atender problemas nacionales (216315).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 120 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de marzo del año 2021, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Secretario	IPICYT
Dr. José Luis Rodríguez López	Sinodal	IPICYT
Dr. José Luis Sánchez García	Sinodal externo	UASLP
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Clara de la Luz Carreón Alvarez

sobre la Tesis intitulada:

Síntesis y conjugación de nanopartículas de oro para aplicaciones biomédicas.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. José Luis Rodríguez López
Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de marzo de 2021.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vález
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mi familia, todos y cada uno de ustedes han sido parte fundamental de todo este proceso, gracias por demostrarme de tantas maneras su amor y su apoyo incondicional. A mis padres, Felipe y Guille sepan que cada uno de mis logros son suyos.

A mis hermanos y sobrinos, son una gran motivación para seguir en este camino.

Rober, gracias por siempre apoyarme y ayudarme a cumplir mis metas.

Agradecimientos

A mis codirectores, el Dr. Rubén y el Dr. José Luis por dejarme ser parte de sus grupos de trabajo y haberme dado la oportunidad de aprender de ellos, por todo el tiempo invertido, por sus consejos, su apoyo incondicional y amistad.

A mi comité tutorial, les agradezco su tiempo y dedicación para realizar correcciones y sugerencias sobre el trabajo durante toda esta etapa.

Al Dr. Víctor Sanabria por las muchas horas invertidas en este trabajo, por enseñarme a trabajar muchas de las técnicas de biología molecular que aquí se presentan y por siempre estar proponiendo nuevas cosas.

Al Dr. Luis Salazar y a su grupo de trabajo por su apoyo con los cultivos celulares con células HeLa, de manera muy especial a la Dra. Angélica Montoya por todo su apoyo técnico. Gracias por hacerme también parte de su grupo.

A la Bióloga Mireya Sánchez Garza por su apoyo técnico en el laboratorio, por estar presente durante toda esta etapa, siempre con una gran disposición de ayudar.

Al Dr. José Luis Sánchez García por todo su apoyo en la síntesis de nanopartículas, gracias por tu amistad.

Al Dr. Antonio de León por proporcionarme las células de cáncer de mama para los ensayos con péptidos.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García (CFATA-UNAM) y al Dr. Javier González Contreras (CIACYT) por las facilidades prestadas para la realización de los ensayos de hipertermia.

Al Dr. Luis Antonio Ortiz Frade (CIDETEQ), por el apoyo en los ensayos de dicroísmo circular.

Dr. Aldo Reséndiz (ESM-IPN) y al Dr. Víctor K. Tsutsumi Fujiyoshi (CINVESTAV) por su apoyo en los ensayos preliminares con células endoteliales.

Al Laboratorio de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), IPICYT, por facilitar el uso de sus instalaciones, en particular a la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado y a la Dra. Mariela Bravo por su apoyo técnico para la caracterización de las muestras por SEM y XPS.

A la Dra. Araceli Patrón (DBM-IPICYT) y al Dr. Daniel Bahena (IPN) por su apoyo en las caracterizaciones de las muestras obtenidas por TEM y HRTEM.

A la Mtra. Dulce Partida y a la Dra. Elizabeth Diane Isaacs Páez por su apoyo en las caracterizaciones por DLS (DCA-IPICYT). Al Q.F.B. Felipe de Jesús Herrera Ponce por su ayuda en el análisis por XPS.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), especialmente a la Lic. Verónica Zárate Chávez por su apoyo en la secuenciación de ADN y caracterización de muestras por ICP-OES.

A cada una de las personas que hicieron posible que concluyera esta etapa de mi vida académica, especialmente a mis amigos del IPICYT. Gracias por todo su apoyo, por hacer más divertidas las horas de comida, por los viajes juntos, por todas las celebraciones y sobre todo gracias por toda su paciencia, gracias por estar. Siempre los recordaré con gran gratitud, un gran cariño y una inmensa nostalgia.

Finalmente, agradezco las becas que me otorgaron el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 333131) y el IPICYT durante mis estudios de doctorado.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas.....	x
Lista de figuras	xi
Figuras suplementarias	xii
Abreviaturas.....	xiii
Resumen	xv
Abstract.....	xvi
I. Introducción general	1
Justificación.....	2
Resultados Principales.....	3
II. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro multiramificadas	4
Introducción.....	4
<i>MBAuNPs para la ablación fototérmica de tumores.....</i>	<i>4</i>
<i>Síntesis de MBAuNPs por el método de crecimiento de semillas.....</i>	<i>5</i>
<i>MBAuNPs para la ablación fototérmica de tumores.....</i>	<i>6</i>
Justificación.....	7
Resultados Principales.....	7
Materiales y métodos	8
Reactivos.....	8
<i>Síntesis de semillas áuricas.....</i>	<i>8</i>
<i>Síntesis controlada de MBAuNPs.....</i>	<i>8</i>
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	9
Microscopía electrónica de transmisión (TEM, HRTEM).....	9
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	9
Análisis de la concentración de semillas áuricas y MBAuNPs.....	9
Contenido de oro en semillas áuricas y MBAuNPs.....	9
Concentración de semillas áuricas.....	10
Aproximación matemática para estimar el área de superficie de cada MBAuNP.....	10
Ensayos de hipertermia	11
Preparación de geles phantom.....	11
Hipertermia en suspensiones acuosas y geles con MBAuNPs.	11
Resultados	14
Tamaño, forma y concentración de nanopartículas	14
Semillas áuricas.	14
MBAuNPs.	14
Hipertermia de semillas áuricas y MBAuNPs en suspensiones acuosas o geles phantom	14
Discusión.....	20
Material suplementario.....	22
Ensayos de Hipertermia.....	22
Interacción de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA por células endoteliales y células HeLa.....	22
Células endoteliales de aorta de rata.....	22
Células HeLa.....	24

III. Formación y estructura de la corona proteínica de MBAuNPs expuestas a seroalbúmina bovina y suero humano	28
Introducción	28
<i>Corona proteínica de las nanopartículas</i>	<i>28</i>
<i>Seroalbúmina, proteína modelo para caracterizar la CP.....</i>	<i>29</i>
<i>Caracterizaciones previas de la CP formada por albúmina en AuNPs.....</i>	<i>30</i>
<i>Justificación.....</i>	<i>31</i>
<i>Resultados Principales.....</i>	<i>31</i>
Materiales y métodos	32
<i>Funcionalización de las MBAuNPs con BSA.....</i>	<i>32</i>
<i>Cuantificación de BSA</i>	<i>32</i>
Por espectrometría UV-VIS	32
Estimación del número de moléculas de BSA por MBAuNP.....	33
Microscopía electrónica de transmisión (TEM, HRTEM).....	33
Espectrometría de electrones fotoemitidos por rayos X (XPS).....	33
Suero humano	35
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	35
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio</i>	<i>35</i>
<i>Dicroísmo circular (DC) de la BSA.....</i>	<i>35</i>
Resultados	36
<i>Área superficial y corona de BSA en MBAuNPs</i>	<i>36</i>
<i>Espectros XPS</i>	<i>43</i>
<i>Dicroísmo circular de la BSA y BSA unida a MBAuNPs</i>	<i>43</i>
<i>Unión de BSA y proteínas del suero humano a MBAuNPs y MBAuNPs-BSA.....</i>	<i>43</i>
Discusión.....	48
IV. Péptidos afines a células MDA-MB-231 y HeLa, desplegados por clones del fago M13KE	51
Despliegue en fagos	51
<i>Identificación de péptidos con alta afinidad por células blanco a partir de bibliotecas combinatorias.....</i>	<i>52</i>
<i>Justificación.....</i>	<i>53</i>
Material y métodos	54
<i>Cultivos de las líneas MDA-MB-231 y HeLa.....</i>	<i>54</i>
<i>Tamizaje de la biblioteca de fagos M13KE.....</i>	<i>54</i>
<i>Ligandos peptídicos que se unen a la superficie de células MDA-MB-231 o HeLa desplegados en clones del fago M13KE</i>	<i>55</i>
<i>Amplificación de fagos tamizados.....</i>	<i>55</i>
<i>Titulación de los fagos</i>	<i>56</i>
<i>Selección de las clonas de fagos.....</i>	<i>56</i>
<i>Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de viriones de fagos de la cuarta ronda de tamizaje</i>	<i>56</i>
<i>Secuenciación del ADN de las clonas positivas</i>	<i>57</i>
Resultados	58
Discusión.....	69
V. Discusión general	71
VI. Referencias.....	73
VII. Artículos publicados y presentaciones en congresos	82

Lista de tablas

Tabla 1. Análisis de dispersión dinámica de luz de semillas áuricas y MBAuNPs.....	16
Tabla 2. Análisis de dispersión dinámica de luz de semillas áuricas, MBAuNPs y MBAuNPs-BSA	38
Tabla 3. Cálculo del área de superficie de MBAuNP que contienen 8, 12 y 20 picos, y número de moléculas de BSA unidas a cada nanopartícula en la corona dura y blanda	42
Tabla 4. Enlaces químicos de Au y S identificados por XPS en MBAuNPs y MBAuNPs-BSA.....	45
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia espaciadora con los insertos que codifican los dodecapéptidos en la biblioteca de M13KE.....	63
Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de las 27 clonas de fagos obtenidas del tamizaje con células MDA-MB-231.....	64
Tabla 7. Secuencias peptídicas consenso 1 del tamizaje con células MDA-MB-231	65
Tabla 8. Secuencias peptídicas consenso 2 del tamizaje con células MDA-MB-231	66
Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de las 27 clonas de fagos obtenidas del tamizaje con células HeLa.....	67
Tabla 10. Secuencias peptídicas consenso del tamizaje con células HeLa	68

Lista de figuras

Figura 1. Imágenes y modelos de nanopartículas de oro con 8 y 20 puntas	13
Figura 2. Microscopía electrónica y espectros UV-VIS normalizados de las semillas áuricas y las MBAuNPs	17
Figura 3. Curso temporal del cambio de temperatura de las suspensiones acuosas que contenían 100 veces más semillas áuricas que MBAuNPs y fueron irradiadas con un láser a 808 nm con diferentes potencias	18
Figura 4. Curso temporal del cambio de temperatura de geles phantom con MBAuNPs, irradiados con potencias variables del láser a 808 nm.....	19
Figura 5. Diagrama de la estructura tridimensional de BSA nativa.....	34
Figura 6. Imágenes HRTEM de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA teñidas con acetato de uranilo y observadas en campo oscuro y campo claro	39
Figura 7. Espectros UV-VIS normalizados de BSA, MBAuNPs y MBAuNPs-BSA.....	40
Figura 8. Curvas de calibración de BSA en solución y en MBAuNPs-BSA.....	41
Figura 9. Espectros XPS de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA	44
Figura 10. Espectros de dicroísmo circular de BSA en solución y de MBAuNPs-BSA con diferentes concentraciones de BSA.....	46
Figura 11. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas a suero humano por 24 h	47
Figura 12. Colonias de <i>E. coli</i> ER2738 infectadas (azules), de las cuales obtuvimos las 30 clonas del fago M13KE en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231	60
Figura 13. Electroferograma que ejemplifica los amplicones generados en mezclas de PCR de las clonas obtenidas en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231.....	61
Figura 14. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de los viriones de una clona recuperada en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231.....	62

Figuras suplementarias

Figura S 1. Hipertermia de semillas áuricas y MBAuNPs en suspensiones acuosas o geles phantom	22
Figura S 2. Curso temporal de la unión de MBAuNPs-BSA a células endoteliales de aorta de rata Wistar en cultivo	24
Figura S 3. Células HeLa sin MBAuNPs	26
Figura S 4. Células HeLa expuestas a MBAuNPs por 24 h.....	26
Figura S 5. Células HeLa expuestas a MBAuNPs-BSA por 24 h	27

Abreviaturas

A_{max}	Absorbancia máxima
ATCC	American Type Culture Collection
AuNPs	Nanopartículas de oro
BSA	Seroalbúmina bovina
CP	Corona proteínica
DC	Dicroísmo circular
D_H	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco
ESEM	Microscopio electrónico de barrido ambiental
HC	Corona dura
HeLa	Línea celular de adenocarcinoma cervical (Henrietta Lacks)
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil] etano-sulfónico
HRTEM	Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución
HSA	Seroalbúmina humana
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-OES	Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
L15	Medio L15 de Leibovitz
LB	Caldo de Luria
LSPR	Plasmón de superficie localizado
M13KE	Vector de clonación M13KE
MBAuNPs	Nanopartículas de oro multirramificadas
MBAuNPs-BSA	Nanopartículas de oro multirramificadas recubiertas con albúmina de suero bovino
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama humano
NIR	Región del Infrarrojo Cercano

NPs	Nanopartículas
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
SC	Corona suave
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SH	Suero humano
ARNasa	Ribonucleasas ()
TBS	Solución salina amortiguada con Tris
TE	Tris-EDTA
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
UV-VIS	Espectroscopía ultravioleta-visible
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

Resumen

Síntesis y conjugación de nanopartículas de oro para aplicaciones biomédicas

La ablación fototérmica de tumores podría llevarse a cabo con nanopartículas de oro multiramificadas (MBAuNPs, por sus siglas en inglés) que tengan absorbancia máxima (A_{max}) en el infrarrojo cercano y funcionalizadas con ligandos que las unan a los marcadores tumorales diana. En este trabajo describimos los avances logrados para obtener MBAuNPs ideales para la ablación fototérmica de tumores: 1) síntesis y caracterización de las MBAuNPs, 2) caracterización de la corona proteínica (CP) de MBAuNPs expuestas a seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y suero humano (SH) y 3) identificación de marcadores moleculares de dos líneas celulares: cáncer de mama (MDA-MB-231) y cáncer del cuello uterino (HeLa) mediante la técnica de despliegue en fagos. Las semillas de Au (oro) sintetizadas generan estequiométricamente MBAuNPs similares a piñatas de 8-20 picos, potencialmente útiles para la ablación fototérmica de tumores, ya que inducen hipertermia por irradiación con un láser de 808 nm a 0.75 W/cm^2 , con incrementos de temperatura de más de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en geles phantom, que simulan la piel. El área de superficie calculada para las MBAuNPs varía de 25 a $41 \text{ } \mu\text{m}^2$, dependiendo del número de picos usados para modelarlas. Las MBAuNPs expuestas a BSA adquieren una CP 'dura' constituida por una película interna de una a dos capas de moléculas de BSA unidas covalentemente a la superficie de cada nanopartícula y una porción externa laxa dada por la aglomeración de moléculas de proteína unidas entre sí por enlaces no covalentes. Las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas a SH adquieren proteínas séricas adicionales. Mediante la técnica de despliegue en fagos, al cabo de cuatro tamizajes seleccionamos 27 clones de fagos con péptidos que se unen fuertemente a la superficie de las células blanco, entre las cuales identificamos cuatro motivos peptídicos consenso: dos para células MDA-MB-231, uno para células HeLa y otro común para ambas líneas celulares.

Palabras clave: Ablación térmica de tumores, Nanopartículas de oro multiramificadas, seroalbúmina bovina, despliegue de fagos

Abstract

Synthesis and conjugation of gold nanoparticles for biomedical applications

Photothermal tumor ablation might be carried out with multibranched gold nanoparticles (MBAuNPs) having maximum absorbance (A_{\max}) in the infrared region, and functionalized with ligands that bind them to the target tumor markers. In this work we describe the progress to obtain ideal MBAuNPs for photothermal ablation of tumors: 1) synthesis, characterization and selection of MBAuNPs, 2) characterization of the protein corona of MBAuNPs exposed to bovine serum albumin (BSA) and human serum (HS), and 3) identification of molecular markers of two cancer cell lines: breast cancer (MDA-MB-231) and cervical cancer (HeLa), using the phage display technique. Synthesized spherical Au seeds stoichiometrically generate *piñata*-like MBAuNPs with 8-20 peaks potentially useful for photothermal tumor ablation, since they induce hyperthermia of more than 4 °C in phantom gels mimicking the skin irradiated with an 808 nm laser at 0.75 W/cm². The surface area calculated for MBAuNPs ranges from 25 to 41 μm², depending of the number of peaks used to model them. MBAuNPs exposed to BSA acquire a protein corona with an internal ‘hard’ portion composed by one or two layers of BSA molecules covalently bound to their surface, and an external ‘soft’ portion formed by agglomerated BSA molecules linked by non-covalent bonds. MBAuNPs and MBAuNPs-BSA exposed to HS acquire additional serum proteins. Using the phage display technique, we selected 27 phage clones with peptides that bind strongly to the surface of the target cells, amongst which we identified four consensus peptide motifs: two for MDA-MB-231 cells, one for HeLa cells, and one common for both cell lines.

Keywords: Local hyperthermia, Thermal ablation of tumors, Multibranched gold nanoparticles, Bovine serum albumin, Phage display

I. Introducción general

Los tumores malignos generalmente son tratados mediante resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia (Beik et al. 2016). La quimioterapia y la radioterapia usualmente son ineficaces y tienen efectos colaterales indeseables (Dai 2016). La hipertermia es una alternativa a la cirugía que puede combinarse con la quimioterapia y la radioterapia para aumentar la eficacia del tratamiento del cáncer (Gao et al. 2016). Esta combinación es infrecuente debido a la distribución no homogénea de la temperatura en el tejido blanco, el posicionamiento impreciso de la radioterapia y la falta de discriminación entre células sanas y cancerosas (Toraya-Brown y Fiering 2014).

Recientemente se han desarrollado nanopartículas (NPs) potencialmente útiles para inducir hipertermia local para el tratamiento del cáncer, que al ser expuestas a radiación láser de longitud de onda y potencia adecuada convierten la energía óptica en calor (Beik et al. 2016). Tres condiciones son necesarias para la terapia nanohipertérmica efectiva de tumores: 1) las NPs deben tener propiedades fototérmicas que conviertan la luz en energía térmica (Dai 2016), 2) el efecto fototérmico debe ocurrir en respuesta a radiación en el espectro infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés) que penetra profundamente pero casi no es absorbida por los tejidos (Weissleder 2001; Schieke et al. 2003; Cho et al. 2009) y 3) las NPs deben funcionalizarse con ligandos que las dirijan a receptores celulares específicos (Van de Broek et al. 2011).

Las NPs de oro (AuNPs) son buenos candidatos para el diagnóstico (obtención de imágenes) y tratamiento de enfermedades porque no son tóxicas (Curry et al. 2014), convierten la luz en energía térmica por el efecto plasmónico dado por la interacción de la luz con los electrones libres de la superficie de los átomos metálicos (Carretero-Palacios et al. 2011), y pueden ser funcionalizadas (Kruse et al. 2011).

Es importante saber que los plasmones son considerados como cuasipartículas formadas por la oscilación de electrones libres de la superficie de

las nanopartículas. Estas formaciones determinan el efecto plasmónico que en este caso se logra por la interacción de la luz (NIR) con los electrones libres de la superficie de las AuNPs. Este tipo más complejo de onda se llama "plasmón superficial" y se mide con espectroscopia UV-VIS.

Hablando específicamente de AuNPs multiramificadas (MBAuNPs), pequeños cambios en el tamaño y la forma de las AuNPs producen grandes cambios en el plasmón de superficie y consecuentemente en la absorción de luz en la región del infrarrojo cercano, que difícilmente se logra con las AuNPs esféricas (Sajanlal et al. 2011). Estas propiedades hacen que las MBAuNPs se estudien ampliamente para explorar su uso en la terapia nanohipertérmica (Li et al. 2014) para la cual deben resolverse dos problemas relevantes: su especificidad hacia los tumores y su tamaño óptimo para el efecto fototérmico (Kang et al. 2015).

Justificación

Es necesario desarrollar opciones terapéuticas que superen la ineficacia y los efectos indeseables de la quimioterapia y la radioterapia empleadas para tratar los tumores malignos. Una de estas opciones es la ablación fototérmica, con AuNPs que transforman la radiación del infrarrojo cercano en energía calorífica y producen hipertermia local que permite eliminar el tejido tumoral sin efectos indeseables. Entre las AuNPs destacan las MBAuNPs por su alta eficiencia para inducir hipertermia, además de que pueden ser funcionalizadas con biomoléculas que las dirijan preferentemente a los tumores.

Para evaluar la idoneidad y toxicidad de las NPs potencialmente útiles para la terapia *in vivo* es esencial caracterizar la corona proteínica (CP) que se forma alrededor de las NPs inmediatamente después de su administración intravenosa y su relación con las propiedades fisicoquímicas que determinan las implicaciones biológicas de las NPs (Lee et al. 2014; Treuel et al. 2015). Por eso nos propusimos sintetizar MBAuNPs ideales para la ablación de tumores, las cuales deben ser capaces de convertir la luz en energía térmica, es decir, elevar la temperatura local mediante irradiación con láseres de baja potencia en el infrarrojo cercano (menor a 1 W/cm^2), estar funcionalizadas con una corona de proteínas séricas de estructura

controlada que pueda ser modificada con ligandos adicionales para dirigirlas a marcadores tumorales específicos de las células diana.

Resultados Principales

En el Capítulo II presentamos la síntesis y caracterización de MBAuNPs útiles para la ablación térmica de tumores y en el Capítulo III la funcionalización de las MBAuNPs con BSA (MBAuNPs-BSA) y la caracterización de los cambios que sufren al ser expuestas a BSA y suero humano (SH). En el Capítulo IV describimos la obtención y caracterización de clonas del fago M13KE que despliegan péptidos de 12 aminoácidos con alta afinidad a marcadores de la superficie de células de la línea MDA-MB-231 (de cáncer de mama) y de la línea HeLa (de cáncer cervicouterino) que llevamos a cabo con el objetivo de funcionalizar en el futuro a las MBAuNPs con péptidos que se unan a marcadores de la superficie de células de cáncer de mama y de cáncer cervicouterino.

II. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro multiramificadas

Introducción

MBAuNPs para la ablación fototérmica de tumores

Los metales nobles como la plata, el oro, o el cobre muestran fuertes resonancias de plasmones superficiales localizados (LSPR, por sus siglas en inglés), que están relacionadas con las oscilaciones de los electrones de conducción producidas durante la interacción del metal con la luz visible o infrarroja cercana. Estas resonancias están fuertemente gobernadas por la forma, el tamaño y la composición de las partículas, así como por las propiedades dieléctricas del propio metal y del medio circundante (Barbosa et al. 2010).

Gracias a las propiedades electrónicas de las nanopartículas de oro (AuNPs) éstas han sido utilizadas en aplicaciones biomédicas desde sus primeras síntesis coloidales hace más de tres siglos (Dreaden et al. 2012). Dentro de las aplicaciones biomédicas, las AuNPs son las principales candidatas para su uso en la terapia fototérmica del cáncer, en la que la luz se convierte en calor gracias al efecto plasmónico de las AuNPs (Espinosa et al. 2016).

Al manipular la forma de las AuNPs se puede sintonizar su resonancia óptica a cualquier longitud de onda de interés. Cuando se irradian a las longitudes de onda adecuadas, las AuNPs pueden servir como fuentes de calor a nanoescala, lo cual puede inducir fototérmicamente la muerte celular y la remisión del tumor (Lal et al. 2008).

Como vimos en la introducción general, los tejidos casi no absorben longitudes de onda del infrarrojo cercano (Weissleder 2001; Schieke et al. 2003; Cho et al. 2009); consecuentemente, el uso de láseres para irradiar las AuNPs con estas longitudes de onda implica baja absorción por los tejidos cercanos al sitio de irradiación.

En el campo de la nanomedicina del cáncer se han explorado NPs de composición, tamaño, forma y arquitecturas variables para su uso como agentes

fototérmicos. Entre ellas, las AuNPs proporcionan una plataforma simple para la ablación térmica debido a su biocompatibilidad (Fazal et al. 2014).

Los esfuerzos para mejorar la eficiencia de conversión de luz a calor se han centrado en el tamaño, la forma o el recubrimiento de la superficie de las AuNPs, así como en el plasmón de superficie localizado en la región del infrarrojo cercano (Dreaden et al. 2012).

Está demostrado que las AuNPs anisotrópicas en general, pero específicamente las multiramificadas (MBAuNPs), como las del presente trabajo, son adecuadas para la ablación fototérmica de tumores (Barbosa et al. 2010), pues la presencia de puntas y bordes afilados en ellas determina mayor sensibilidad a los cambios locales en el entorno dieléctrico (Senthil Kumar et al. 2008). Estas características constituyen la base de los análisis por espectroscopia UV-VIS de los plasmones de superficie, y gracias a esta propiedad, las NPs son capaces de absorber y dispersar la luz incidente, convirtiendo la energía de resonancia en calor que constituye la base de la terapia hipertérmica. Las MBAuNPs son además candidatos para su uso como agentes de terapia fototérmica debido a su gran sección transversal de absorción en la ventana del infrarrojo cercano, por lo cual tras la irradiación con láser producen suficiente calor para destruir las células tumorales (Van de Broek et al. 2011).

Síntesis de MBAuNPs por el método de crecimiento de semillas

Entre los diversos métodos de síntesis de nanopartículas de oro anisotrópicas, el crecimiento mediado por semillas ha sido ampliamente utilizado debido a su versatilidad y a que se pueden lograr diversas formas de nanopartículas como las estrellas (Jiang et al. 2013). En este método la síntesis se lleva a cabo en dos etapas: la etapa de nucleación en la cual se utilizan NPs esféricas de oro como semillas y la etapa de crecimiento, donde se utilizan ciertos componentes como agentes de direccionamiento y agentes reductores de oro. Maiorano et al. (2011) reportaron la síntesis de MBAuNPs con el método de crecimiento de semillas utilizando hidroxilamina (NH_2OH) como agente reductor y HEPES como agente de direccionamiento de forma. Esta síntesis tiene la ventaja de utilizar pocos componentes, realizarse en un tiempo relativamente rápido y controlar de manera

reproducibile la forma y el tamaño de las MBAuNPs. Los mismos autores reportaron la síntesis de MBAuNPs con máximos de absorbancia de 708-720 nm y tamaño de 40-60 nm dependiendo de la concentración de HEPES.

En mi trabajo de tesis de maestría (Carreón Alvarez 2016) sintetizamos MBAuNPs a partir de semillas áuricas modificando el método de Maiorano et al. (2011), en mezclas con variaciones en el contenido de semillas, HEPES e hidroxilamina. Determinamos los espectros de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-VIS) al principio y al final de la síntesis, y la forma y tamaño por microscopía electrónica de barrido (SEM). Obtuvimos MBAuNPs con diámetros entre 95 y 160 nm y absorbancia máxima entre 640 y 873 nm. De esta variedad de MBAuNPs seleccionamos las más prometedoras para su aplicación en la ablación fototérmica de tumores, determinamos la hipertermia inducida por irradiación de las MBAuNPs con un láser a 808 nm (Figuras 3 y 4) en suspensiones acuosas y en geles *phantom* que simulan la piel, y utilizamos métodos adicionales para ampliar su caracterización.

MBAuNPs para la ablación fototérmica de tumores

Diversos estudios han probado la efectividad de las MBAuNPs para la ablación fototérmica de tumores. Células de carcinoma epitelial de ovario humano incubadas con MBAuNPs con absorbancia máxima a 628 nm fueron destruidas por irradiación con un láser de onda continua de 690 nm a 38 W/cm^2 (Van de Broek et al. 2011). Fazal et al. (2014) indujeron la muerte de células de una línea de carcinoma epidermoide con MBAuNPs que absorben luz en el rango de 800-1000 nm por irradiación con un láser a 808 nm con potencia de 6 W/cm^2 . Espinosa et al. (2016) emplearon MBAuNPs de 25 a 150 nm y absorbancia máxima entre 700 y 950 nm en ensayos de hipertermia con láseres de 680, 808 y 1064 nm y potencias de 1 W/cm^2 sobre células de cáncer de próstata en cultivo y en ratones con tumores sólidos de cáncer de próstata; concluyeron que el tamaño y el recubrimiento de la MBAuNPs son los factores más importantes para asegurar su distribución en ensayos *in vivo*. En un modelo *in vivo* de glioblastoma, sobrevivieron al cáncer los ratones a los que se aplicaron MBAuNPs en los tumores y fueron irradiados (Liu et al. 2019). En el primer ensayo clínico exitoso en humanos publicado recientemente, en pacientes con cáncer de próstata se logró la ablación del 94% de los tumores

con nanoconchas de oro-silica irradiadas con un láser de 800 nm y potencia de 6.5 W/cm² (Rastinehad et al. 2019).

Justificación

Las MBAuNPs se han estudiado ampliamente para utilizarlas en la terapia fototérmica del cáncer porque generan calor por irradiación del espectro. Sin embargo, los principales problemas que deben resolverse para maximizar el efecto fototérmico siguen siendo la mejora de su especificidad (*tumor-targeting*) y la optimización de su tamaño.

La hipertermia generalizada o localizada, empleada para eliminar los tumores, es ineficaz y tiene efectos adversos porque no sólo afecta a las células cancerosas sino a las células normales. Los tratamientos para la ablación térmica de tumores deben ser más específicos, eficaces e inocuos. La hipertermia basada en el efecto plasmónico de nanopartículas de oro anisotrópicas —de tamaño adecuado, absorción máxima de luz cercana al infrarrojo, conjugadas con biomoléculas que las dirijan a las células cancerosas— está siendo utilizada para mejorar la ablación térmica de tumores.

Resultados Principales

El propósito de este trabajo fue sintetizar y seleccionar MBAuNPs anisotrópicas con un tamaño ≤ 100 nm de diámetro, absorbancia máxima en el infrarrojo medio (700-900 nm) y capaces de inducir hipertermia controlada por irradiación con un láser de 808 nm de potencia variable, en geles que simulan la piel y contienen las MBAuNPs seleccionadas.

Sintetizamos las MBAuNPs por el método de crecimiento de semillas áuricas y las caracterizamos mediante espectrofotometría UV-VIS, SEM, microscopía electrónica de transmisión (TEM), Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) y dispersión dinámica de luz (DLS). Evaluamos el incremento de temperatura del medio en el que se encontraban las MBAuNPs irradiadas con potencias variables de un láser a 808 nm. Las semillas esféricas de Au generaron estequiométricamente MBAuNPs con forma de piñatas de 8-20 picos, potencialmente útiles para la ablación fototérmica de tumores, con

absorbancia máxima en 775 nm y radio hidrodinámico de 125 nm, que inducen hipertermia de más de 4 °C en geles fantasma (que simulan la piel) por irradiación con un láser de 808 nm a 0.75 W/cm².

Materiales y métodos

Reactivos

Ácido cloroáurico (HAuCl₄), HEPES sal sódica (99.5%), hidroxilamina (NH₂OH), citrato de sodio 99%, seroalbúmina bovina (BSA), agar y polvo de polietileno fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. TX-151 proviene de Balmar, L.L.C, Nonidet P40 ultrapuro de Thermo Scientific, ácido clorhídrico (HCl) de J.T. Baker y ácido nítrico (HNO₃) de CTR Scientific.

Síntesis de semillas áuricas

Llevamos a cabo la síntesis de semillas esféricas con el método de Turkevich a partir de HAuCl₄ 25 mM y citrato de sodio 0.75 mM pH 7.4 como agente reductor (Turkevich et al. 1951; Frens 1973; Kimling et al. 2006).

A un vaso de precipitados de 30 mL con una barra magnética añadimos 19.8 mL de citrato de sodio 0.75 mM pH 7.4 y lo mantuvimos a 70 °C con agitación sobre una parrilla eléctrica. Inmediatamente después añadimos 0.2 mL de HAuCl₄. Mantuvimos la mezcla en estas condiciones por 40 min hasta que cambió de color, empezando con gris claro y finalizando en rojo con aspecto de vino tinto. Cuando finalizó la reacción registramos el espectro UV-VIS con el espectrofotómetro Agilent, Cary 60. Para conocer la forma y tamaño de las nanopartículas, analizamos las muestras en el microscopio electrónico de barrido (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600) y obtuvimos imágenes con 5 KV, 88 pA, distancia de trabajo de 4 mm y aumento de 300,000×.

Síntesis controlada de MBAuNPs

Sintetizamos las MBAuNPs en una mezcla con HAuCl₄ 0.8 mM, 10¹⁵ de semillas áuricas por L (60 mg/L of Au), NH₂OH 100 mM y Hepes 50 mM pH 7.4.

Mantuvimos sumergida la sonda del espectrofotómetro (A₃₀₀-A₁₀₀₀, velocidad de lectura media) en el vaso de precipitados de 30 mL con una barra magnética,

colocado dentro de un recipiente con hielo para registrar la lectura inicial (blanco) y cada 2 min mientras ocurría la reacción. Añadimos primero 12.5 mL de HEPES 50 mM pH 7.4 y luego 150 μ L de semillas, 400 μ L de hidroxilamina 100 mM y 2.2 mL de H₂AuCl₄ 0.8 mM (1 gota cada 8 s).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

A un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 500 μ L de etanol añadimos 1 mL de la mezcla de síntesis de MBAuNPs. Luego sonicamos la mezcla en un baño ultrasónico por 5 min, la mezclamos con el vórtex por 20 s y la centrifugamos 10 min a 13,000 rpm (15,304 $\times g$) y 7 °C. Eliminamos el sobrenadante por aspiración cuidadosa, añadimos a la pastilla 1 mL de agua MilliQ y repetimos seis veces este lavado por centrifugación. En un porta muestra (pin) de aluminio depositamos 75 μ L de la muestra y la dejamos secar toda la noche antes de observarla en el SEM (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600) con un aumento de 300,000 \times para semillas áuricas y de 150,000 \times para MBAuNPs, 5 KV, 88 pA y distancia de trabajo de 4 mm.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM, HRTEM)

Teñimos muestras de MBAuNPs puras con acetato de uranilo en placas de Petri cubiertas con Parafilm. Sobre una rejilla (Lacey Carbon) dejamos sedimentar una gota con MBAuNPs 2 h a temperatura ambiente. Después de añadir acetato de uranilo (10 μ g/ μ L), dejamos secar las muestras por 15 min antes de observarlas al TEM (Jeol 200 CX 100 keV) y el HRTEM (Jeol ARM200F).

Dispersión dinámica de luz (DLS)

El potencial ζ y el tamaño de las MBAuNPs fue determinado por DLS con un zetámetro (Zetatrac, Microtrac) a 22 °C con un ángulo de dispersión de 90°. Los medios utilizados como vehículos de las suspensiones de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA fueron Nonidet P40 al 0.1% en PBS, BSA disuelta en PBS y suero humano.

Análisis de la concentración de semillas áuricas y MBAuNPs

Contenido de oro en semillas áuricas y MBAuNPs. Para determinar la cantidad de oro presente en las semillas áuricas y en las MBAuNPs, una alícuota de cada muestra fue digerida con HCl y HNO₃ en baño maría durante 1 h. Las

muestras fueron analizadas por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Varian, modelo 730-ES).

Concentración de semillas áuricas. La concentración de Au obtenida por ICP-OES fue utilizado para determinar el número de semillas áuricas por litro (Allabashi et al. 2009), dividiendo el número total de átomos de oro en la muestra por el número de átomos por NP, con las siguientes fórmulas:

$$N_{at} = \frac{N_A \pi \rho D^3}{6M}$$

$$N = A_t N_{at}$$

En donde:

N_{at} = Promedio de átomos por nanopartícula

N_A (número de Avogadro) = 6.022×10^{23} átomos/mol

ρ (densidad de fcc de las semillas) = 1.93×10^{-20} g/nm³

D (diámetro de las nanopartículas) = 18 nm

M (peso atómico del oro) = 197 g/mol

A_t (número de átomos totales en la muestra) = 1.3889×10^{20} átomos/L, obtenido del análisis de ICP-OES

Aproximación matemática para estimar el área de superficie de cada MBAuNP

Para determinar el área superficial de las MBAuNP se modeló su forma como una piñata con picos, es decir, una estructura formada por un núcleo esférico a cuya superficie se unen las bases de los conos con puntas romas. La superficie total de cada MBAuNP estaría dada por las siguientes contribuciones: (i) el área total del núcleo esférico, menos (ii) el área de los casquetes de esfera que ocupan las N bases de los conos, más (iii) el área de N conos truncados, más (iv) N veces el área de la media esfera que forma la punta de los conos (Tsoulos et al. 2017). En este orden aparecen los términos en la siguiente ecuación para el área total:

$$A(1) = 4\pi a^2 - 2\pi a \sum_{i=1}^N \left(a - \sqrt{a^2 - R_i^2} \right) + \sum_{i=1}^N \left\{ \pi(r_i + R_i) \sqrt{(R_i - r_i)^2 + h_i^2} + 2\pi r_i^2 \right\}$$

Donde,

Radio promedio del núcleo: $a = 34$ nm

Radio promedio de la punta: $r_i = 4.67$ nm

Largo promedio de la punta: $h_i = 29.16$ nm

Radio promedio de la base de la punta: $R_i = 15.1$ nm

Los valores asignados a estas variables proceden de las estadísticas de las micrografías SEM de las MBAuNPs.

La Figura 1 ilustra NPs ‘tipo piñata’ con 8 y 20 puntas, donde N es el número de picos por NP. Considerando que las MBAuNPs tienen diferente número de puntas, se utilizó una primera aproximación geométrica con valores de N de 8, 12 y 20 (Cabrera-Trujillo et al. 2010).

Ensayos de hipertermia

Preparación de geles phantom. Preparamos geles phantom en cajas de Petri con agua desionizada, agar, TX-151 (polvo de solidificación) y polvo de polietileno (Chahat et al. 2012), con 4.1×10^9 o 6.2×10^9 MBAuNPs/mL.

A un matraz Kitasato añadimos 100 mL de agua Milli-Q, 1.5 g de agar y 2.5 g de TX-151. Calentamos la mezcla en el horno de microondas por periodos de 15 s hasta la disolución completa del agar y TX-151. A la mezcla, mantenida bajo agitación a 50 °C, añadimos las MBAuNPs y 2 g de polvo de polietileno. Cuando el polvo de polietileno se disolvió aplicamos vacío con la bomba de vacío para soluciones acuosas (Welch, Modelo 2522) para eliminar las burbujas de aire. Vertimos la mezcla en cajas de Petri de 35×10 mm y la dejamos solidificar toda la noche a temperatura ambiente.

Hipertermia en suspensiones acuosas y geles con MBAuNPs. Llevamos a cabo los ensayos en tubos con suspensiones acuosas y en geles phantom que contenían semillas áuricas o MBAuNPs (Fig. S 1).

Irradiamos cada tubo o gel por 10 min con el láser a 808 nm (Lasermate modelo IML-808) con diferentes potencias ópticas (0.2, 0.15 y 0.1 W) que corresponden a intensidades ópticas de 1, 0.75 y 0.45 W/cm² (laser spot=0.2 cm²). Medimos la temperatura de cada muestra con una cámara térmica Infrared (Flexcam R2 modelo IR) desde el tiempo cero hasta el final de la irradiación.

En tubos de microcentrifuga de 500 µL colocamos suspensiones acuosas de semillas áuricas (6.9×10^{11} semillas/mL), MBAuNPs (6.9×10^9 MBAuNPs/mL) y agua pura y determinamos el curso temporal de la temperatura utilizando agua pura como blanco.

En los geles phantom determinamos el curso temporal de la temperatura de suspensiones con 4.1×10^9 o 6.2×10^9 MBAuNPs/mL, utilizando como blanco un gel sin MBAuNPs.

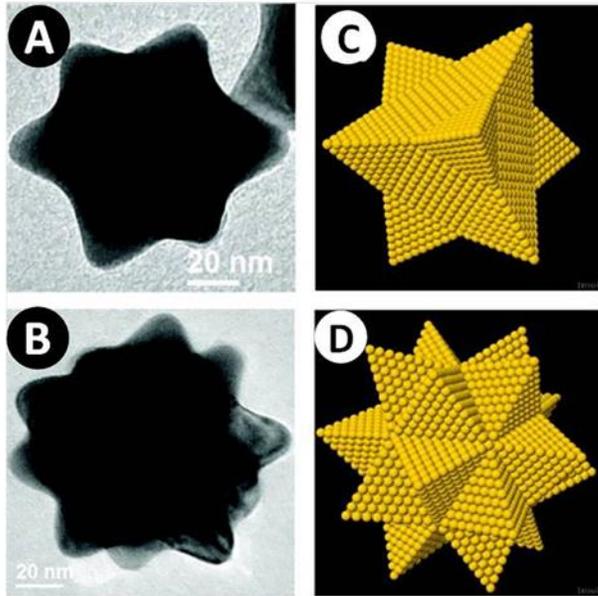


Figura 1. Imágenes y modelos de nanopartículas de oro con 8 y 20 puntas

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de MBAuNPs con 8 puntas (A) y 20 puntas (B). Modelos que simulan la imagen de 8 puntas (C) y la imagen de 20 puntas (D). Reproducido con permiso, American Chemical Society (Cabrera-Trujillo et al. 2010).

Resultados

Tamaño, forma y concentración de nanopartículas

Semillas áuricas. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron semillas esféricas, con diámetro hidrodinámico (D_H) de 18 nm (Figura 1A y 1B, Tabla 1); la superficie promedio calculada de las semillas fue de 1,020 nm² que tuvieron una absorbancia máxima a 520 nm (Figura 1C).

El potencial ζ de las semillas fue de -36.8 mV, con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.602 (Tabla 1). La concentración, determinada por ICP-OES, de 60 mg/L, equivale a 1×10^{15} semillas/L.

MBAuNPs. Las imágenes TEM y SEM mostraron nanopartículas anisotrópicas multiramificadas con 8-20 picos, D_H de 125 nm (Figura 1D y 1E; Tabla 1), absorbancia máxima de 775 nm y nula absorbancia en 520 nm (Figura 1F). El potencial ζ de las MBAuNPs fue de -24.4 mV, con un PDI de 0.455 (Tabla 1). La concentración de las MBAuNPs determinado por ICP-OES fue de 23.5 mg/L, que equivale a 1×10^{13} MBAuNPs/L.

Las áreas superficiales calculadas para las MBAuNPs de 8, 12 y 20 picos fueron de 24,984 nm², 30,212 nm² y 40,669 nm², respectivamente (25 a 41 μm^2 , Tabla 2).

Hipertermia de semillas áuricas y MBAuNPs en suspensiones acuosas o geles phantom

Los incrementos de temperatura fueron monitoreados en soluciones acuosas que contenían semillas áuricas (60 mg/L) o MBAuNP (23.5 mg/L) y en geles phantom que contenían MBAuNP (2 o 3 mg/L). Todas las muestras se irradiaron continuamente durante 10 minutos con un láser de 808 nm a intensidades ópticas de 1.00, 0.75 y 0.45 W/cm².

El aumento de la temperatura en agua y en suspensiones acuosas con intensidades ópticas de 0.75 W/cm² fue: agua, 1.3 °C; semillas áuricas, 1.7 °C; MBAuNPs, 14.3 °C (Figura 2A). El aumento de temperatura en suspensiones acuosas de MBAuNPs con diferentes intensidades ópticas (restando el aumento de agua) fue: 0.45 W/cm², 4.2 °C; 0.75 W/cm², 13 °C; 1 W/cm², 10.7 °C (Figura 2B).

El aumento de temperatura en geles phantom que contenían MBAuNPs (2 mg/L de Au) con intensidades ópticas crecientes fue: 0.45 W/cm², 0.1 °C; 0.75 W/cm², 3.7 °C; 1 W/cm², 3.9 °C (Figura. 3A). En geles phantom con MBAuNPs (3 mg/L de Au) con intensidades ópticas crecientes, el aumento fue: 0.45 W/cm², 0.7 °C; 0.75 W/cm², 4.8 °C; 1 W/cm², 5.2 °C (Figura 3B) (Carreón Alvarez 2016).

Tabla 1. Análisis de dispersión dinámica de luz de semillas áuricas y MBAuNPs

Muestra	En PBS		
	D_H (nm)	PDI	potencial ζ (mV)
Semillas	18	0.602	-36.8
MBAuNPs	123	0.455	-24.4

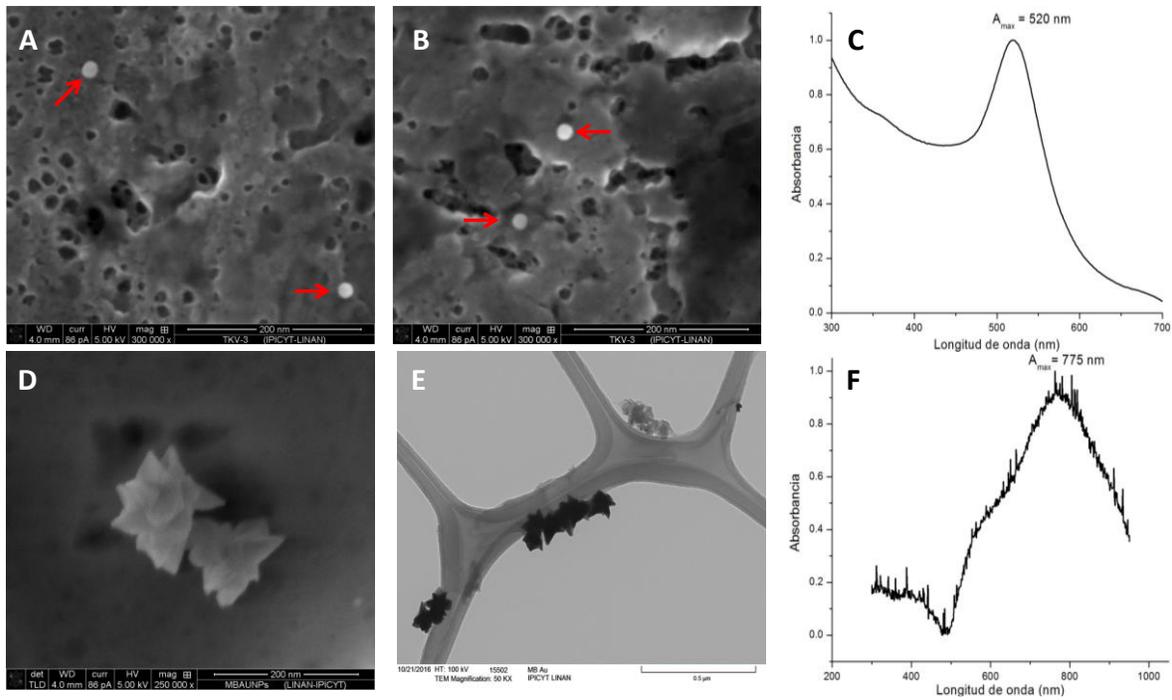


Figura 2. Microscopía electrónica y espectros UV-VIS normalizados de las semillas áuricas y las MBAuNPs

(A) y (B) Imágenes de las semillas áuricas en microscopía electrónica de barrido (esferas claras indicadas con las flechas rojas) y (C) su espectro UV-VIS. Aspecto de las MBAuNPs en microscopía electrónica de barrido (D) y de transmisión (E) y (F) su espectro UV-VIS. Los espectros fueron normalizados para $A_{max} = 1.0$.

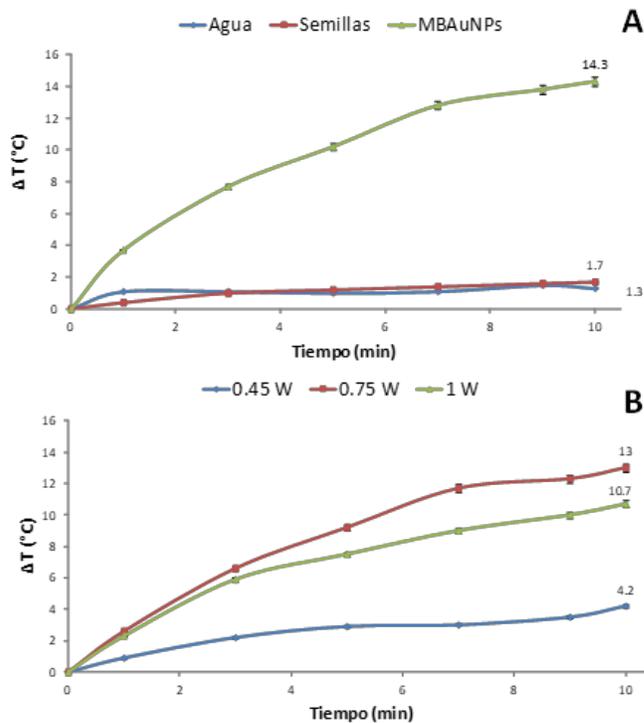


Figura 3. Curso temporal del cambio de temperatura de las suspensiones acuosas que contenían 100 veces más semillas áuricas que MBAuNPs y fueron irradiadas con un láser a 808 nm con diferentes potencias

Se irradiaron suspensiones que contenían 1×10^{12} semillas ($60 \mu\text{g}$) por mL o 1.5×10^{11} MBAuNPs ($23.5 \mu\text{g}$) por mL de forma continua con diferentes potencias de irradiación utilizando un láser de 808 nm. (A) MBAuNPs y suspensiones de semillas con intensidad óptica de 0.75 W/cm^2 . (B) Suspensiones de MBAuNPs con intensidades ópticas de 0.45, 0.75 o 1 W/cm^2 . Error de las medidas de temperatura: $\pm 2\%$ (Carreón Alvarez 2016).

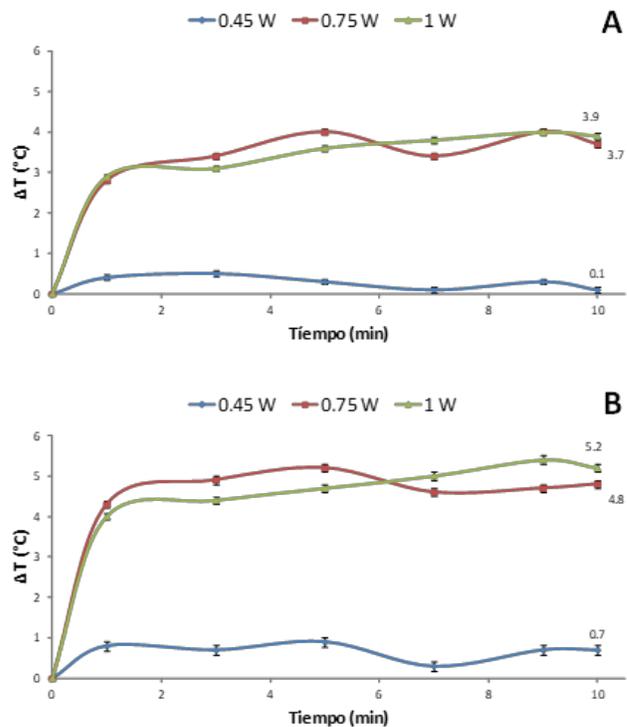


Figura 4. Curso temporal del cambio de temperatura de geles phantom con MBAuNPs, irradiados con potencias variables del láser a 808 nm.

(A) Gel con 1.3×10^{10} MBAuNPs (2 μg) por mL. (B) Gel con 1.9×10^{10} MBAuNPs (3 μg) por mL. Error de las medidas de temperatura: $\pm 2\%$ (Carreón Alvarez 2016).

Discusión

Las MBAuNPs descritas en este capítulo son potencialmente útiles para la ablación fototérmica de tumores pues inducen hipertermia cuando son excitadas con un láser que emite luz en el infrarrojo cercano con potencias mínimas. Estos experimentos fueron llevados a cabo tanto en suspensiones acuosas como en geles phantom que simulan la piel humana.

Las semillas áuricas, sintetizadas como precursoras de las MBAuNPs, son esféricas y estables como se esperaba (Kimling et al. 2006), tienen absorbancia máxima a 520 nm y excelente estabilidad y dispersión, como muestra el análisis DLS. Además, su concentración fue determinada con el método de ICP-OES reportado por Allabashi et al. (2009) para controlar la cantidad de semillas utilizadas para la síntesis de MBAuNPs, que se llevó a cabo con ligeras modificaciones del método de Maiorano et al. (2011). Las MBAuNPs resultantes tuvieron absorbancia máxima a 775 nm, lo que indica una mayor eficacia para producir hipertermia por irradiación NIR, y la pérdida del pico de absorbancia de 520 nm sugiere que cada semilla da lugar a una MBAuNP. El mayor desplazamiento del pico de absorción hacia el infrarrojo puede deberse a la concentración relativamente más alta de HEPES (50 mM) utilizada para la síntesis, que conduce a una mayor longitud de los picos de las MBAuNPs.

La mayor eficiencia fototérmica se alcanzó con suspensiones que contenían 3 mg/L de MBAuNPs en geles phantom irradiados con el láser de 808 nm a intensidad óptica de 0.75 W/cm^2 , cuya temperatura aumentó $4.8 \text{ }^\circ\text{C}$, superior al aumento reportado por otros autores (Gannon et al. 2008; Munireddy et al. 2012; Li et al. 2013; Mocan et al. 2017). Podemos concluir además que el nivel de hipertermia depende principalmente de tres factores: 1) del medio en el que se encuentran suspendidas las MBAuNPs; 2) de la concentración de las MBAuNPs y 3) de la potencia de irradiación utilizada.

Aunque nuestros ensayos de hipertermia con geles phantom que contienen MBAuNPs han sido exitosos, es necesario explorar en el futuro su eficacia en cultivos celulares y/o modelos animales.

En experimentos preliminares observamos la unión de las MBAuNPs en células endoteliales de aorta de rata y de cáncer cervicouterino (Material suplementario) que podríamos extender para probar la utilidad de las MBAuNPs en ensayos de hipertermia in vitro.

Material suplementario

Ensayos de Hipertermia

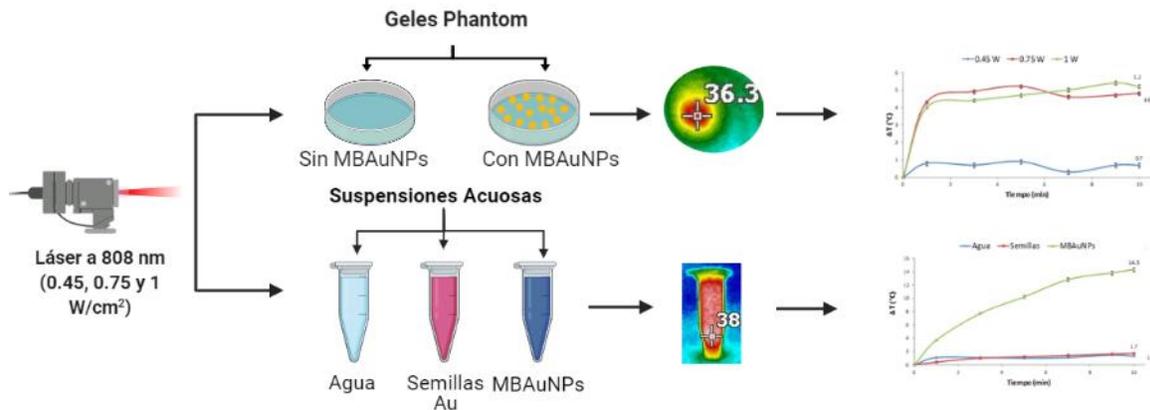


Figura S 1. Hipertermia de semillas áuricas y MBAuNPs en suspensiones acuosas o geles phantom

Llevamos a cabo los ensayos en tubos con suspensiones acuosas y en geles phantom que contenían semillas áuricas o MBAuNPs.

Irradiamos cada tubo o gel por 10 min con el láser a 808 nm (Lasermate modelo IML-808) con diferentes intensidades ópticas (0.45, 0.75 y 1 W/cm²). Medimos la temperatura de cada muestra con una cámara térmica Infrared (Flexcam R2 modelo IR) desde el tiempo cero hasta el final de la irradiación.

Interacción de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA por células endoteliales y células HeLa

Células endoteliales de aorta de rata

Para probar si las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA se unen a la superficie de las células endoteliales de aorta en cultivo primario y son internalizadas, las incubamos 24 h después de haber añadido las nanopartículas, fijamos los cultivos con glutaraldehído y los observamos con el microscopio de contraste de fases.

Preparamos cultivos primarios de células endoteliales de la aorta de ratas Wistar macho en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas del Dr. Aldo Reséndiz Albor (Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de

México). A cada caja de Petri de 35 mm añadimos 10^5 células y 1.5 mL de medio de cultivo (DMEM) suplementado con suero fetal de bovino al 10%. Al cabo de 24 h descartamos el medio usado y añadimos DMEM fresco con o sin suero, e inmediatamente después añadimos a cada caja 150 μ L de una suspensión con 6.9×10^9 MBAuNPs o MBAuNPs-BSA (20,000 nanopartículas por célula). Luego incubamos las cajas por 30 min, 3 h, 12 h y 24 h, aspiramos el medio usado, lavamos las cajas dos veces con 500 μ L de DMEM fresco y fijamos cada caja por 1 h con 250 μ L de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.1 M pH 7.4. Luego lavamos cada caja dos veces con 300 μ L de amortiguador de cacodilato, la almacenamos en el refrigerador con 300 μ L del mismo amortiguador y la observamos con el microscopio de contraste de fases.

Observamos MBAuNPs (partículas oscuras) asociadas al citoplasma a partir de las 3 h, que aumentaron en número a medida que transcurrió el tiempo después de haber añadido las nanopartículas (Fig. S 2). No pudimos cuantificar diferencias entre las MBAuNPs puras y funcionalizadas, ni determinar por TEM si las nanopartículas estaban localizadas en la superficie o en el interior de las células debido a que en este experimento preliminar el número de células ancladas a la superficie de las cajas de cultivo fue muy bajo.

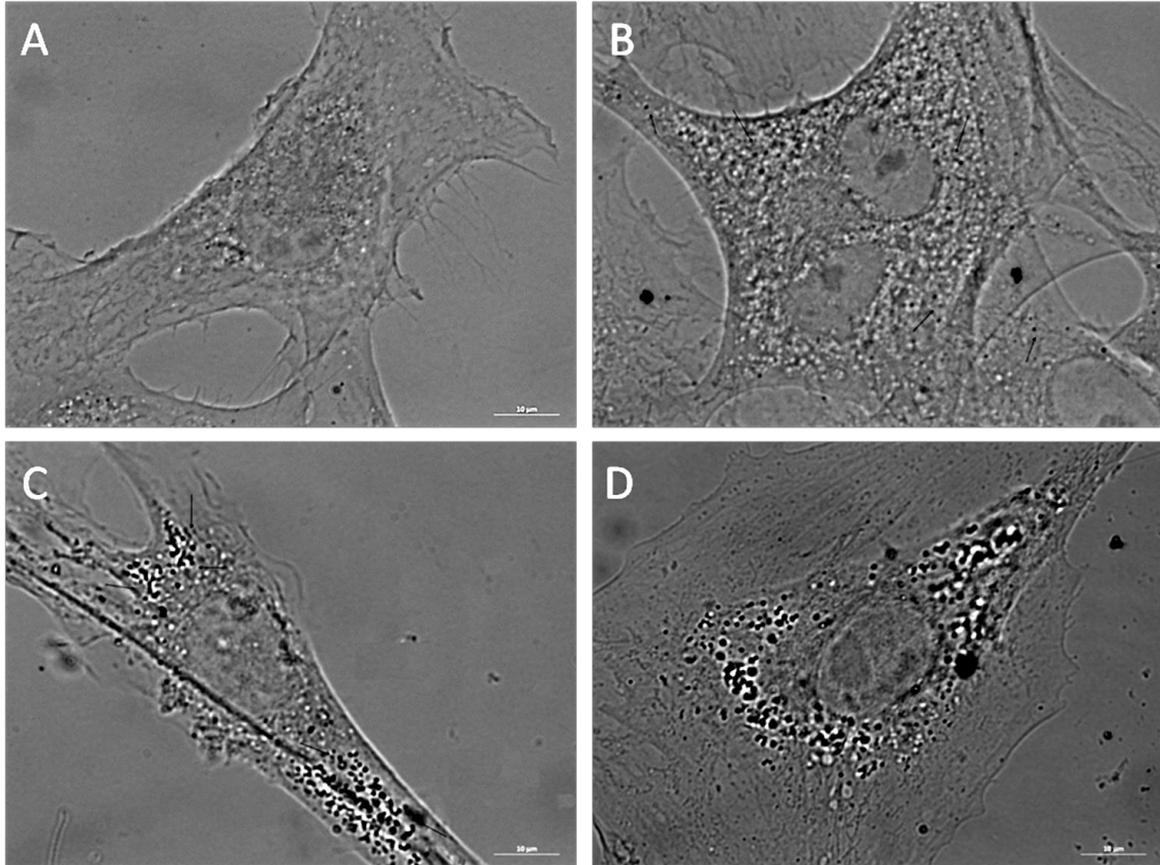


Figura S 2. Curso temporal de la unión de MBAuNPs-BSA a células endoteliales de aorta de rata Wistar en cultivo

Las imágenes muestran células únicas en cultivo a diferentes tiempos después de la adición de MBAuNPs-BSA. (A) 0 min. (B) 3h. (C) 12 h. (E) 24 h.

Células HeLa

Analizamos la interacción de MBAuNPs por células de la línea HeLa en cultivos con un número mayor de células y los observamos mediante microscopia electrónica de barrido.

Células HeLa de cáncer cervicouterino, adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC), fueron inoculadas a cajas de Petri de 3 cm sobre cubreobjetos siliconizados, e incubadas a 37 °C en medio L15 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Cuando los cultivos llegaron a confluencia descartamos el medio usado, añadimos medio fresco con suero, e inmediatamente después añadimos a cada caja 150 µL de una suspensión con $\sim 4 \times 10^3$ MBAuNPs o MBAuNPs-BSA por

célula. Después de la adición incubamos las cajas por 24 h, aspiramos el medio usado, lavamos las cajas dos veces con 300 μ L de PBS y las fijamos 1 h con 250 μ L de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.1 M pH 7.4. Luego lavamos cada caja dos veces con 300 μ L de amortiguador de cacodilato y la almacenamos con 300 μ L del mismo amortiguador y la observamos con el microscopio electrónico de barrido ambiental (FEI - ESEM-QUANTA 200). Incluimos controles negativos de células sin MBAuNPs para comparar su morfología a lo largo del tiempo de exposición. Cuando los cultivos llegaron a confluencia los expusimos 24 h a nanopartículas puras y funcionalizadas con BSA.

La Figura S3 muestra los cultivos de células HeLa sin nanopartículas, utilizados como grupo control. La Figura S4 muestra los cultivos después de 24 h de exposición a MBAuNPs, sin alteración morfológica, pero con MBAuNPs acumuladas en el citoplasma (partículas brillantes). La Figura S5 muestra los cultivos expuestos a MBAuNPs-BSA por 24 h, con mayor acumulación de las MBAuNPs-BSA en la región perinuclear (partículas brillantes).

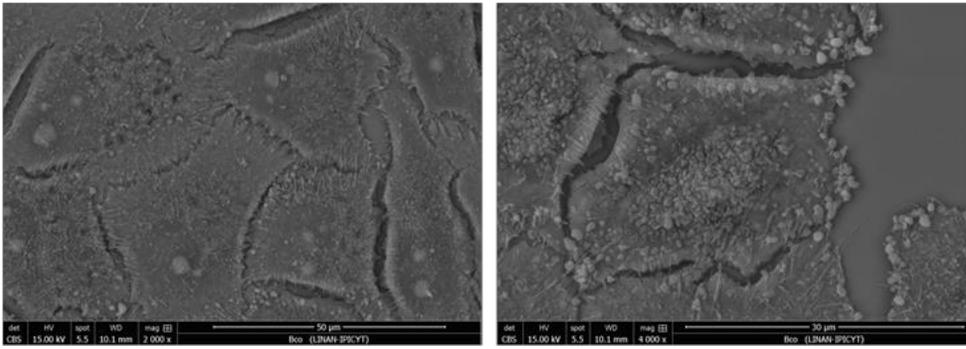


Figura S 3. Células HeLa sin MBAuNPs

Ambas imágenes muestran células HeLa en cultivo sin MBAuNPs, este grupo fue utilizado como control.

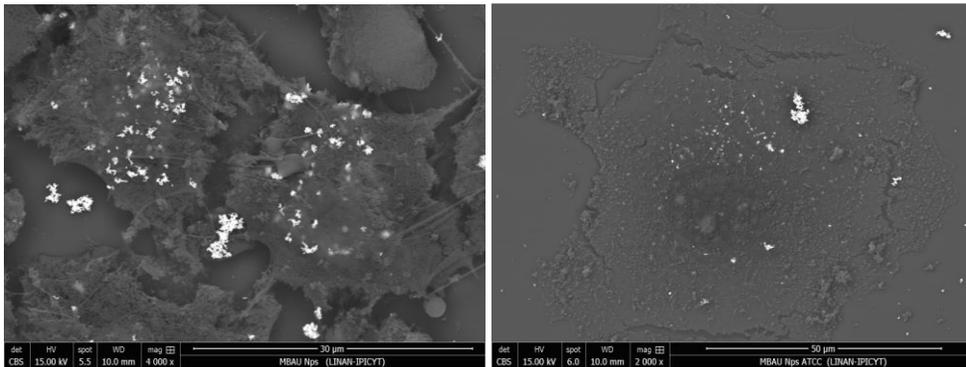


Figura S 4. Células HeLa expuestas a MBAuNPs por 24 h

Ambas imágenes muestran células HeLa en cultivo con MBAuNPs, no observamos diferencias en la morfología de las células comparado con el grupo control, las partículas o cúmulos brillantes fueron identificadas como MBAuNPs

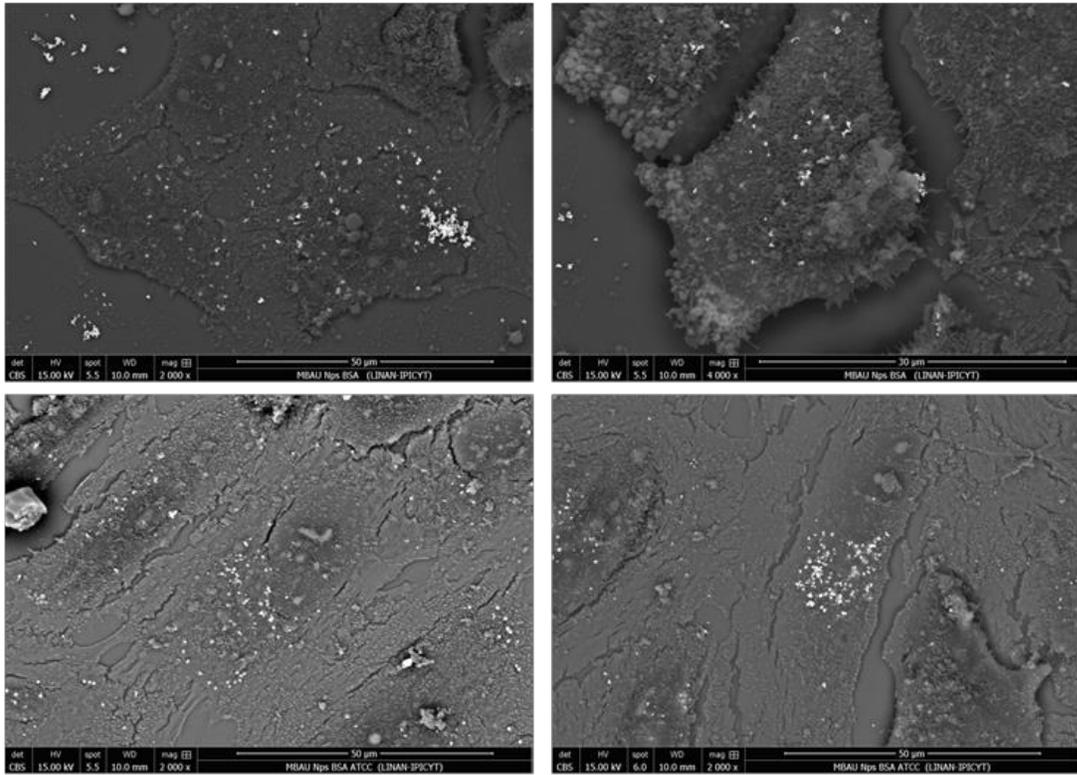


Figura S 5. Células HeLa expuestas a MBAuNPs-BSA por 24 h

Ambas imágenes muestran células Hela en cultivo con MBAuNPs-BSA, no observamos diferencias en la morfología de las células comparado con el grupo control, sin embargo, observamos una mayor cantidad de MBAuNPs-BSA (partículas o cúmulos brillantes).

III. Formación y estructura de la corona proteínica de MBAuNPs expuestas a seroalbúmina bovina y suero humano

Introducción

Corona proteínica de las nanopartículas

La eficacia de la administración de fármacos y otras terapias de la nanomedicina depende en gran medida de la capacidad de las NPs para llegar al tejido diana (García-Álvarez et al. 2018). En una secuencia perfecta de eventos, las NPs se inyectan en el torrente sanguíneo donde el ligando inmovilizado sobre la superficie de las NPs reconoce al receptor específico en el tejido diana y el fármaco se libera de forma controlada.

Sin embargo, una vez que las NPs son inyectadas en un entorno fisiológico, su superficie se modifica por la interacción con los componentes sanguíneos, principalmente proteínas. Es bien sabido que en las NPs se forma espontáneamente una estructura dinámica de capas de proteína denominada 'corona proteínica' (CP) (Corbo et al. 2016; García-Álvarez et al. 2018). Este proceso dinámico es regido por las afinidades y constantes de equilibrio de cada tipo de proteína a la superficie de cada tipo de NP y a las variaciones en la composición de las proteínas de los fluidos biológicos (Carrillo-Carrion et al. 2017).

La CP consta de dos capas pobremente delimitadas, conocidas como corona dura y corona suave (HC y SC, respectivamente, por sus siglas en inglés), que son afectadas por la complejidad del entorno y el equilibrio entre la superficie de las NPs y las proteínas. La HC está formada por proteínas asociadas fuertemente a las NP, mientras que la SC es una capa externa de proteínas unidas débilmente (Pederzoli et al. 2017).

Los estudios sobre el curso temporal de la composición de la CP han demostrado que el proceso de formación de complejos NP-CP está sujeto a cambios continuos y que la adsorción de proteínas a la superficie se rige

principalmente por interacciones de afinidad de las proteínas a la superficie de las NPs y por interacciones proteína-proteína (Monopoli et al. 2011). Por eso, aunque el plasma sanguíneo está constituido por miles de proteínas y algunas son más abundantes, su concentración en el plasma no corresponde a su abundancia en la CP (Corbo et al. 2016).

A su vez, el complejo NP-CP determina diversas respuestas biológicas tales como la fibrilación, la captación celular, el tiempo de circulación, la biodisponibilidad e incluso la toxicidad. La adsorción proteínica no controlada sobre las NPs generalmente tiene efectos negativos tales como la eliminación rápida del torrente sanguíneo, la obstaculización de la capacidad de direccionamiento y la inducción de toxicidad (Nguyen y Lee 2017).

Seroalbúmina, proteína modelo para caracterizar la CP

Conocer la relación de las NPs con la corona proteínica es un aspecto crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos en nanomedicina, pues la corona define la identidad biológica de las NPs e influye en características relevantes como citotoxicidad, interacciones con componentes celulares y extracelulares, distribución corporal y endocitosis por células específicas (Ritz et al. 2015; Miclaus et al. 2016).

En esta etapa del trabajo nuestro principal objetivo fue caracterizar la CP de las MBAuNPs tomando como proteína modelo a la albumina sérica bovina (BSA) y a la albúmina sérica humana (HSA) presente en el suero humano (SH), que son las más abundantes en la sangre y han sido identificadas con mayor abundancia en la corona de proteínas de las NPs (Ramezani y Rafii-Tabar 2015), por lo que juegan un papel relevante en la modulación de las propiedades fisicoquímicas y la biodisponibilidad de las NPs (Nguyen et al. 2018). Además, la seroalbúmina une y transporta numerosos compuestos endógenos y exógenos. Su baja actividad biológica, vida media prolongada y capacidad para unir moléculas grasas (y por lo tanto poco solubles en agua) ha determinado su relevancia para la administración dirigida de fármacos (Siligardi y Hussain 2012). Otra característica de la albúmina de interés para nuestro proyecto es que varias proteínas y receptores putativos de diversos tejidos y líneas celulares, incluyendo la superficie de células tumorales, unen seroalbúmina. Además, como en los tumores sólidos el drenaje linfático es

insuficiente, hay acumulación de macromoléculas como la albúmina en el intersticio tumoral. Los tumores son además un sitio de catabolismo de albúmina, que utilizan como fuente de aminoácidos y energía (Merlot et al. 2014).

Caracterizaciones previas de la CP formada por albúmina en AuNPs

Diversos estudios han investigado la interacción de las AuNPs con la albúmina, pero no hemos encontrado reportes sobre el análisis de la CP en MBAuNPs. En el caso de las AuNPs esféricas, Cui et al. (2014) encontraron que éstas adquieren una CP de BSA de 6-8 nm de espesor, que corresponde a una monocapa o bicapa de la proteína.

También se han reportado cambios en el espectro UV-VIS de las AuNPs después de funcionalizarlas con BSA. Estos cambios, como observamos en nuestro trabajo previo (Carreón Alvarez 2016), dependen tanto del vehículo como de la concentración de BSA empleada para la funcionalización. En este contexto, Ferrante et al. (2015) funcionalizaron AuNPs con tamaño promedio de 7 nm y absorbancia máxima en 520 nm y observaron que el plasmón de resonancia se desplazó muy poco hacia el infrarrojo (hasta 3 nm, con la mayor concentración de BSA) después de funcionalizarlas con BSA disuelta en agua; sin embargo, cuando la funcionalización se llevó a cabo con BSA disuelta en PBS los cambios en el espectro fueron mucho más marcados, incrementando el desplazamiento a medida que la concentración de BSA aumentaba. Además, observaron que esta funcionalización mantiene la estabilidad coloidal de las AuNPs y mediante DC determinaron que la estructura secundaria de la BSA no cambia significativamente al unirse a las AuNPs.

Khant et al. (2015) sintetizaron AuNPs con diámetros variables (3-40 nm) para analizar la CP que adquieren al funcionalizarlas con BSA o HSA. El incremento en el D_H después de funcionalizar las AuNPs dependió del tamaño de la AuNPs siendo de hasta ~20 nm con las AuNPs más grandes (40 nm); estos 20 nm corresponden a la CP que adquiere la AuNPs después de su funcionalización, independientemente de que se utilice BSA o HSA. Además, calcularon unas 200 moléculas de proteína unidas a cada AuNP con D_H de 40 nm. Se han reportado

también cambios en el potencial ζ de las AuNPs después de la funcionalización con BSA, que contribuyen a su estabilidad coloidal (Brewer et al. 2005).

Se ha demostrado que la corona de albúmina preformada en las NPs disminuye la asociación inespecífica y reduce la tasa de depuración del organismo. Los conjugados personalizados de albúmina-NP también han permitido la degradación controlada de NPs y la liberación de fármacos (Brewer et al. 2005). La preformación de la corona de BSA es un enfoque prometedor para mejorar la bioestabilidad de los fármacos y desarrollar formulaciones de NPs de acción prolongada (Peng et al. 2015).

Justificación

Los datos mencionados antes dan cuenta de que la CP es compleja y única para cada nanomaterial y que cambia propiedades fisicoquímicas de las NPs como el tamaño, la carga superficial y el estado de agregación (Nguyen y Lee 2017). Estos cambios puede interferir con las funcionalidades previstas en los microambientes biológicos (Foroozandeh y Aziz 2015; Corbo et al. 2017).

Las MBAuNPs ideales para la ablación de tumores deben ser funcionalizadas con una corona de proteínas séricas de estructura conocida y controlada.

Para evaluar la idoneidad y toxicidad de las NPs presentadas en el capítulo anterior, potencialmente útiles para la terapia *in vivo*, es esencial caracterizar la CP y su relación con las propiedades fisicoquímicas que determinan las implicaciones biológicas de las MBAuNPs (Lee et al. 2014; Treuel et al. 2015).

Resultados Principales

En este capítulo describimos las características de la corona proteínica que adquieren MBAuNPs expuestas a BSA, a SH ya BSA seguida de SH. Las MBAuNPs expuestas a BSA adquieren una corona proteínica con una porción interna 'dura' compuesta por una o dos capas de BSA con 1,000 a 4,000 moléculas unidas covalentemente a la superficie, y una porción externa 'blanda' formada por aglomerados de moléculas de BSA unidas por enlaces no covalentes. La funcionalización con BSA disminuye la tendencia de las MBAuNPs a aglomerarse y aumenta la dispersión de su tamaño. Las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas a SH adquieren HSA y otras proteínas presentes en el SH con tamaños entre 25 y

180 kDa, que aumentan el diámetro hidrodinámico y disminuyen la estabilidad de las MBAuNPs y las MBAuNPs-BSA. Concluimos que las MBAuNPs expuestas a HSA y SH adquieren instantáneamente la corona de proteína dura y blanda que puede afectar la funcionalización previa de las MBAuNPs que haya sido realizada para dirigirlas a objetivos celulares o tisulares específicos.

Materiales y métodos

Funcionalización de las MBAuNPs con BSA

Para la funcionalización, 7.6×10^{11} MBAuNP/mL se lavaron cinco veces mediante centrifugación con Nonidet P40 al 0.1%. Para el último lavado se utilizó solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 18 mM pH 7.4), y se registró el espectro UV-VIS antes y después de la funcionalización. Después del sexto lavado, el sobrenadante se eliminó por aspiración, el sedimento se sonicó en un baño ultrasónico (Branson, Modelo 2800) durante 4 min y se agitó en vórtex durante 15 s; se añadió 1 ml de BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y la mezcla se agitó en vórtex inmediatamente después, para evitar la aglomeración de las MBAuNPs. La suspensión de MBAuNPs-BSA se mantuvo a 4 °C durante 24 h y luego se lavó cuatro veces mediante centrifugación con PBS para eliminar la BSA en solución.

Cuantificación de BSA

Por espectrometría UV-VIS

Como hay una correlación lineal entre la concentración de proteína en solución y la intensidad de la absorción a 280 nm, utilizamos el espectro UV-VIS y el coeficiente de extinción molar de la BSA para determinar el número de moléculas de proteína por nanopartícula. Los coeficientes de extinción molar de la BSA en solución y las suspensiones de MBAuNP-BSA se calcularon comparando las pendientes de las curvas estándar de BSA en solución y de las suspensiones de MBAuNP-BSA incluidas en una celda de cuarzo con trayectoria óptica de 0.2 cm.

Para determinar el número promedio de moléculas de BSA por MBAuNP se realizaron siete lavados consecutivos por centrifugación con PBS después de 24 h

de exposición a BSA; después se dividió el número de moléculas de BSA (estimado a partir de la A_{280} y el coeficiente de extinción molar) entre el número de MBAuNPs.

Estimación del número de moléculas de BSA por MBAuNP

La aproximación matemática para calcular el número de moléculas de BSA por MBAuNP se realizó dividiendo el área de superficie total promedio disponible en cada MBAuNP (calculada como ya se explicó) entre el área que ocuparían las moléculas de BSA nativas que tienen una estructura tridimensional con un área de 28 nm^2 (Figura 11) (He y Carter 1992; Yu et al. 2016).

Si en la corona hubiese una segunda capa de BSA adherida a la superficie de cada MBAuNP, el área total sería:

$$A(2) = A(1) + \sum_{i=1}^N \{ \pi(r_i + R_i) \sqrt{(R_i - r_i)^2 + h_i^2} + 2\pi r_i^2 \}$$

Para una corona proteínica uniforme de 4 nm de espesor, utilizaríamos los siguientes valores:

Radio promedio de la punta: $r_i = 8.67 \text{ nm}$

Largo promedio de la punta: $h_i = 33.16 \text{ nm}$

Radio promedio de la base de la punta: $R_i = 18.1 \text{ nm}$

Microscopía electrónica de transmisión (TEM, HRTEM)

Realizamos la síntesis y funcionalización de las MBAuNPs-BSA con las técnicas descritas y las teñimos con acetato de uranilo en cajas de Petri cubiertas con papel Parafilm. Sobre una rejilla (Lacey Carbon) dejamos sedimentar una gota de muestra concentrada por 2 h a temperatura ambiente. Después de añadir acetato de uranilo ($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), dejamos secar las muestras por 15 min antes de observarlas con el TEM (Jeol 200 CX 100 keV) y el HRTEM (Jeol ARM200F).

Espectrometría de electrones fotoemitidos por rayos X (XPS)

Sobre placas de silicio ($1 \times 1 \text{ cm}$) depositamos una gota de suspensión de MBAuNPs o MBAuNPs-BSA. Dejamos secar las muestras a temperatura ambiente por 24 h, las analizamos al ultra-alto vacío en un espectrómetro de electrones fotoemitidos por rayos X PHI-5000 (Physical Electronics, Modelo VersaProbe II) y procesamos los resultados con el software XPS Multipak.

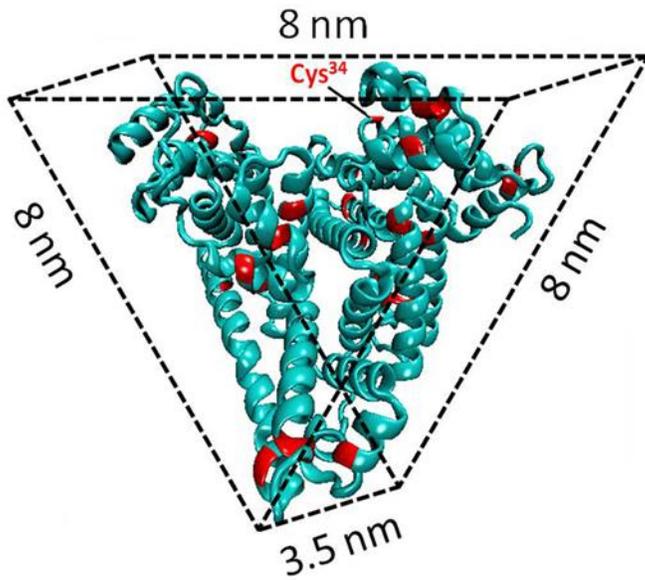


Figura 5. Diagrama de la estructura tridimensional de BSA nativa

La imagen muestra la estructura tridimensional de BSA como un prisma triangular equilátero. La cisteína 34 puede participar en la unión de BSA al oro. Adaptado con autorización (2016), Copyright 2016, The Royal Society of Chemistry.

Suero humano

La sangre fue obtenida con el consentimiento informado de cuatro donadores sanos de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se dejó coagular espontáneamente. La sangre coagulada se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm y el suero se transfirió a tubos de plástico de 15 mL. El suero de los cuatro donadores fue mezclado y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

El potencial ζ y el tamaño de las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA fue determinado por DLS con un zetámetro (Zetatrac, Microtrac) a 22 °C con un ángulo de dispersión de 90°. Los medios utilizados como vehículos de las suspensiones de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA fueron Nonidet P40 al 0.1%, PBSy BSA disuelta en PBS.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

La interacción de las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas al suero humano se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Después de 24 h de exposición al suero humano (37 °C) las muestras se lavaron tres veces por centrifugación (13,000 rpm, 10 min); 10 μ L de cada muestra se mezcló con 10 μ L de solución amortiguadora de Laemmli. Las muestras fueron aplicadas a geles de poliacrilamida al 12%, se corrieron durante 2 h a 120 V, se tiñeron con azul de Coomassie por 30 min y se destiñeron toda la noche en una mezcla de metanol-agua-ácido acético glacial.

Dicroísmo circular (DC) de la BSA

Realizamos las mediciones de DC en un espectropolarímetro MOS-500 (BioLogic Science Instruments) a 4 °C con una celda de cuarzo de 0.2 cm y un rango de lectura de 205-330 nm. Las concentraciones de BSA fueron de 0.25, 0.5 y 1mg/mL en PBS, con una concentración fija de 6.9×10^9 MBAuNPs/mL. Calculamos el porcentaje de hélices alfa de la BSA con las siguientes fórmulas (Yu et al. 2013; Selva Sharma y Ilanchelian 2015):

$$MRE = \frac{DC \text{ Observado (mdeg)}}{10Cpl}$$

$$\text{Hélices alfa}(\%) = \frac{-MRE_{222*} - 4000}{33000 - 4000} \times 100$$

En donde:

MRE = Elipticidad residual media

DC Observado (mdeg) = Elipticidad obtenida directamente del DC

Cp = Concentración molar de la proteína

n = Número de aminoácidos de la proteína

l = Longitud de la celda en cm

4000 y 33000 denotan el valor total de elipticidad de las hojas beta y las hélices alfa de la proteína.

*Esta fórmula se utiliza para el valor de MRE en 208 o 222 nm.

Resultados

Área superficial y corona de BSA en MBAuNPs

Las imágenes TEM y HRTEM de MBAuNPs funcionalizadas mostraron una capa de 10-15 nm de espesor que cubría su superficie y estaba ausente en las MBAuNPs sin proteína (Figura 4). Los valores de D_H aumentaron de 125 nm para las MBAuNPs a 146 nm para las MBAuNPs-BSA. El potencial ζ de las MBAuNPs fue de -72.7 mV, con un PDI de 0.929 (Tabla 2).

Los espectros UV-VIS de las suspensiones de BSA pura y suspensiones de MBAuNPs funcionalizadas con BSA se determinaron usando PBS como vehículo. Los picos de absorbancia observados fueron los siguientes: BSA pura, un solo pico a 280 nm; MBAuNPs puras, un solo pico a 775 nm; MBAuNPs-BSA, dos picos, uno mayor a 280 nm y otro menor a 825 nm (Figura 5).

El coeficiente de extinción molar de la BSA en solución fue de 43,377 $M^{-1}cm^{-1}$, y el de la BSA unida a las MBAuNPs fue de 41,866 $M^{-1}cm^{-1}$ (Figura 6).

El número promedio de moléculas de BSA en una suspensión que contenía 7.6×10^{11} MBAuNPs/mL se calculó con espectroscopia UV-VIS. La concentración de BSA en MBAuNPs-BSA lavadas por centrifugación y resuspendidas en PBS fue de

4.5×10^{16} moléculas por mL, que equivalen a 59,210 moléculas de BSA por cada MBAuNP. Las suspensiones de MBAuNPs-BSA lavadas seis veces con PBS contenían 1.14×10^{15} moléculas de BSA por mL, que corresponden a 1,500 moléculas de BSA por MBAuNP (2.5% del total de moléculas de BSA añadidas inicialmente).

Mediante cálculos matemáticos del área de superficie de las MBAuNPs y teniendo en cuenta el área de cada molécula de BSA, calculamos 3.5×10^{12} moléculas por cm^2 . Asumiendo que la corona de proteína dura está formada por una monocapa de moléculas de BSA, el número de moléculas de proteína por cada MBAuNP sería de ~900, ~1,000 y ~1.500 dependiendo del número de puntas de la MBAuNP (8, 12 y 20 puntas). Suponiendo una bicapa de proteínas, el número de moléculas de BSA por MBAuNP sería de ~1,900, ~2,500 y ~3,880, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2. Análisis de dispersión dinámica de luz de semillas áuricas, MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Muestra	En PBS			En suero humano	
	D _H (nm)	PDI	potencial ζ (mV)	D _H (nm)	Potencial ζ (mV)
Semillas	18	0.602	-36.8	ND	ND
MBAuNPs	123	0.455	-24.4	148	-18
MBAuNPs- BSA	138	0.929	-72.7	185	-31

*ND. No determinado

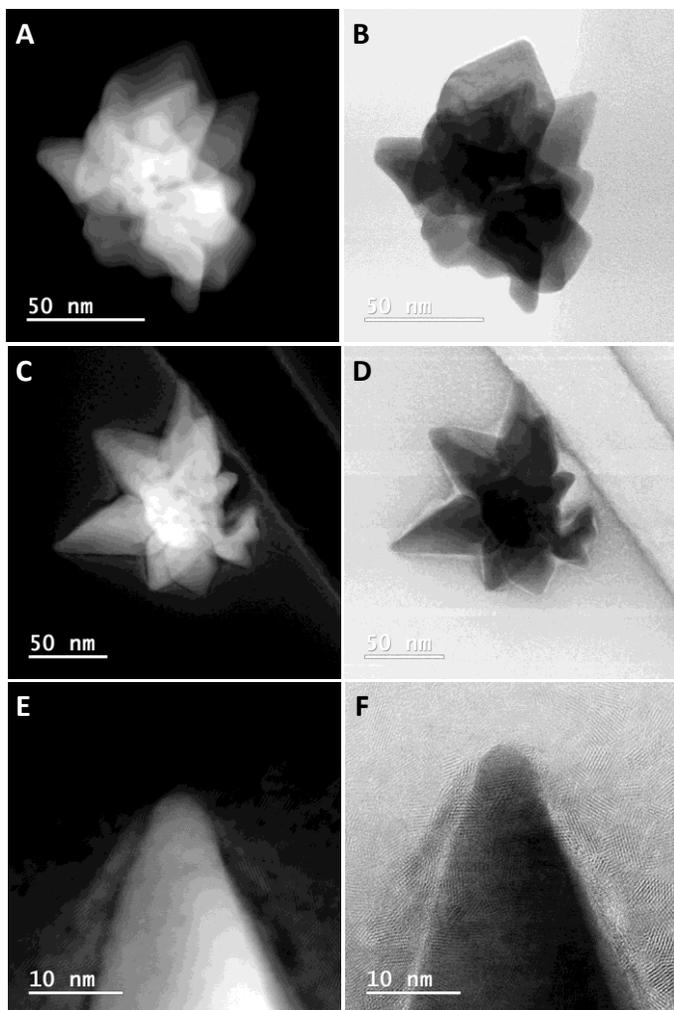


Figura 6. Imágenes HRTEM de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA teñidas con acetato de uranilo y observadas en campo oscuro y campo claro

MBAuNP en campo claro (A) y campo oscuro (B). MBAuNP-BSA en campo claro (C) y campo oscuro (D). (E) Imagen C amplificada 5×. (F) Imagen D amplificada 5×.

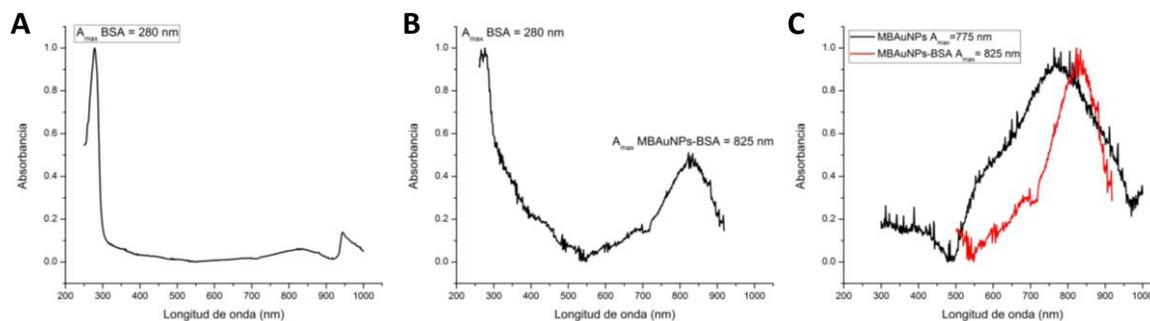


Figura 7. Espectros UV-VIS normalizados de BSA, MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Los espectros fueron normalizados para $A_{max} = 1.0$. (A) Solución de BSA ($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). (B) Suspensión de MBAuNPs-BSA ($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). (C) Comparación de los espectros de suspensiones de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA.

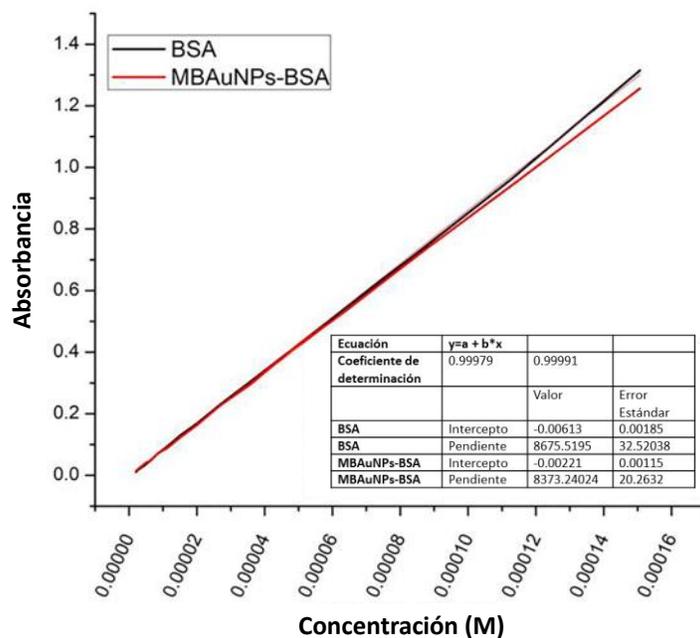


Figura 8. Curvas de calibración de BSA en solución y en MBAuNPs-BSA

Las concentraciones de BSA en solución y suspensiones de MBAuNPs-BSA variaron de 0.13 a 10 mg/mL (2 a 1500 μ M). Se utilizaron concentraciones equivalentes de BSA para BSA en solución y en MBAuNPs-BSA (7.6×10^{11}). Línea negra: BSA en solución. Línea roja: BSA en MBAuNPs-BSA.

Tabla 3. Cálculo del área de superficie de MBAuNP que contienen 8, 12 y 20 picos, y número de moléculas de BSA unidas a cada nanopartícula en la corona dura y blanda

Picos	Corona dura		Corona blanda	
	Superficie de MBAuNPs (nm²)	Moléculas de BSA	Superficie de MBAuNP (nm²)	Moléculas de BSA
8	24,983	900	52,193	1,900
12	30,212	1,000	71,000	2,500
20	40,668	1,500	108,652	3,880

Espectros XPS

El espectro XPS de oro de alta resolución de MBAuNP puras tuvo tres picos (incluidos sus dobletes) a 82.37 eV, 82.87 eV y 85.06 eV, correspondientes a Au⁰, Au¹⁺ y Au³⁺, respectivamente. En contraste, el espectro de oro de alta resolución de MBAuNPs-BSA tuvo dos picos: el primero a 81.31 eV identificado como Au⁰ y el segundo a 82.11 eV identificado como un enlace C-S-Au (I) (Figuras 7A y 7B, Tabla 4). El espectro de azufre de alta resolución tenía el pico principal a 166.21 eV, correspondiente a la posición S 2_{p3/2} identificado como un enlace S-Au (Tabla 4, Figura 7C).

Dicroísmo circular de la BSA y BSA unida a MBAuNPs

Mediante DC evaluamos la estructura secundaria de BSA en soluciones con diferentes concentraciones de BSA pura (1, 0.5 y 0.25 mg/mL) o unida a las MBAuNPs.

En los espectros de cada concentración de BSA pura y unida a MBAuNPs se observaron picos a 208 y 222 nm, característicos de estructuras proteínicas de α -hélice (Yu et al. 2013; Selva Sharma y Ilanchelian 2015) con intensidad menor en la BSA unida a MBAuNPs, que correlacionó con la disminución de la proporción de α -hélices (Figura 8). No sabemos si estos cambios afectan los dominios de unión al receptor de BSA que se encuentra en la superficie de las células endoteliales.

Unión de BSA y proteínas del suero humano a MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Después de exponer MBAuNPs o MBAuNPs-BSA a suero humano durante 24 h y lavarlas varias veces por centrifugación con PBS, el potencial ζ fue -18 para las MBAuNPs y -31 para las MBAuNPs-BSA; el PDI fue 0.205 para MBAuNP y 0.167 para MBAuNPs-BSA; y el D_H fue de 148 nm para las MBAuNPs y 185 nm para MBAuNPs-BSA.

Además, las MBAuNPs y MBAuNPs-BSA que habían sido expuestas 24 h al suero humano sometidas a desnaturalización con SDS liberaron bandas de proteínas con pesos moleculares aparentes de 180, 156, 120, 84, 75 y 25 kDa (Figura 9).

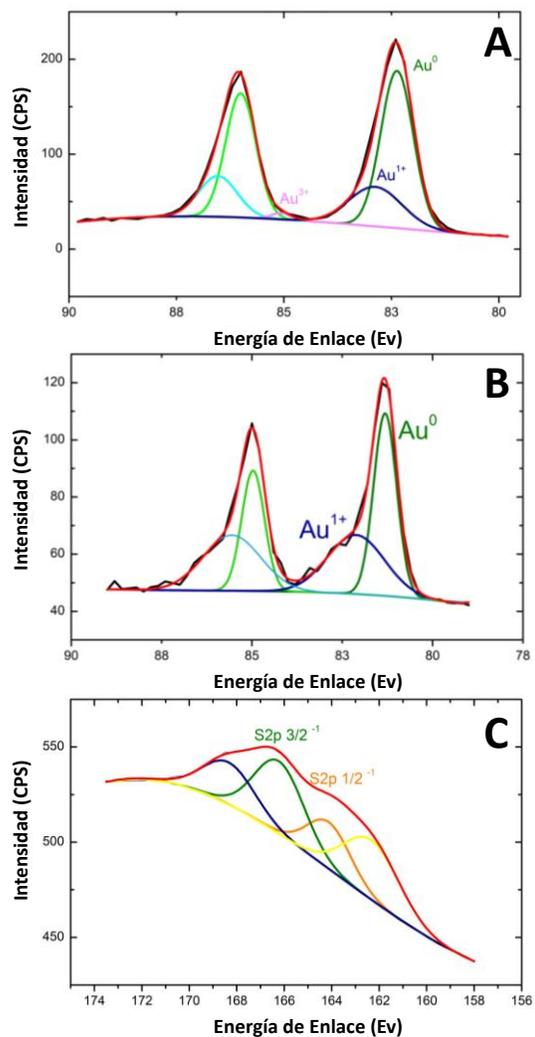


Figura 9. Espectros XPS de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Espectros de alta resolución de Au en MBAuNPs (A) y MBAuNPs-BSA (B).
Espectros de alta resolución del azufre en MBAuNPs-BSA (C).

Tabla 4. Enlaces químicos de Au y S identificados por XPS en MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Muestra	Pico	Posición (eV)	ID
MBAuNPs (Au)	Au ⁰	82.37	Au
	Au ⁰	86	Au doblete
	Au ¹⁺	82.87	N-Au (I)
	Au ¹⁺	86.53	Au doblete
	Au ³⁺	85.06	Au (III)
MBAuNPs-BSA (Au)	Au ⁰	81.31	Au
	Au ⁰	84.96	Au doblete
	Au ¹⁺	82.11	C-S-Au (I)
	Au ¹⁺	85.55	Au Doblete
MBAuNPs-BSA (S)	S 2p _{3/2}	166.21	S-Au
	S 2p _{1/2}	164.12	Doblete

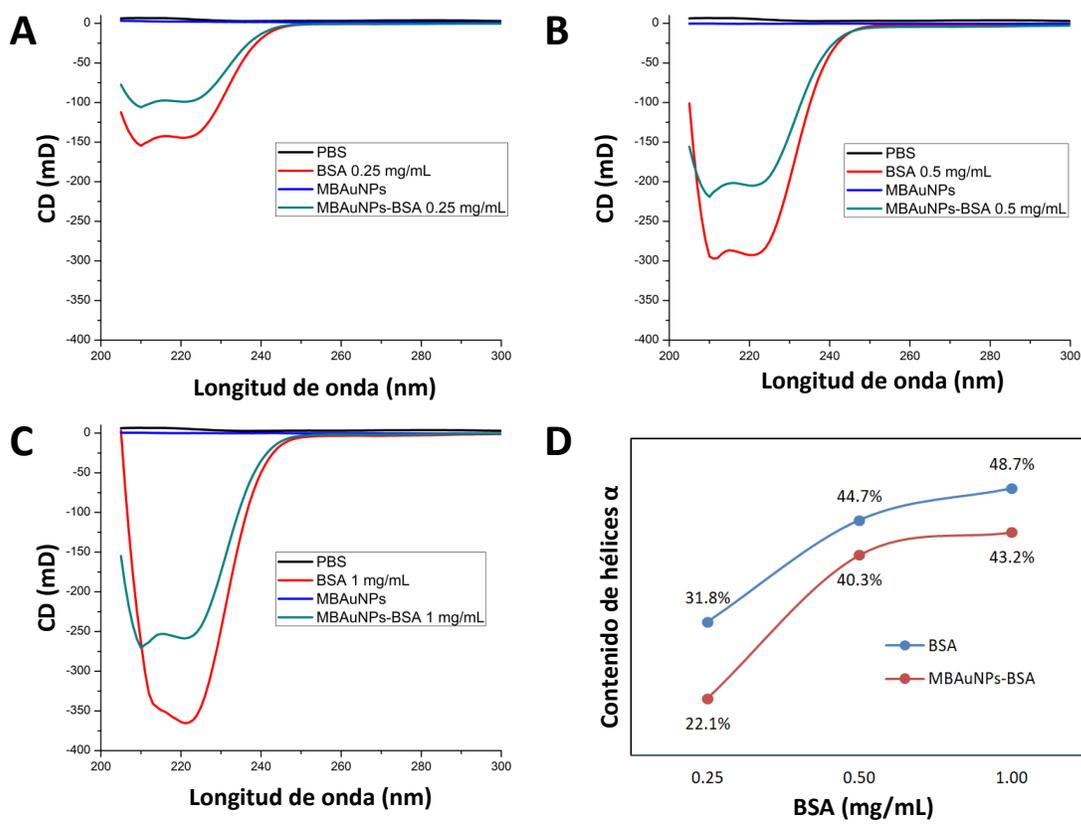


Figura 10. Espectros de dicroísmo circular de BSA en solución y de MBAuNPs-BSA con diferentes concentraciones de BSA

(A) 1 mg/mL BSA. (B) 0.5 mg/mL BSA. (C) 0.25 mg/mL BSA. (D) Proporción de alfa hélices.

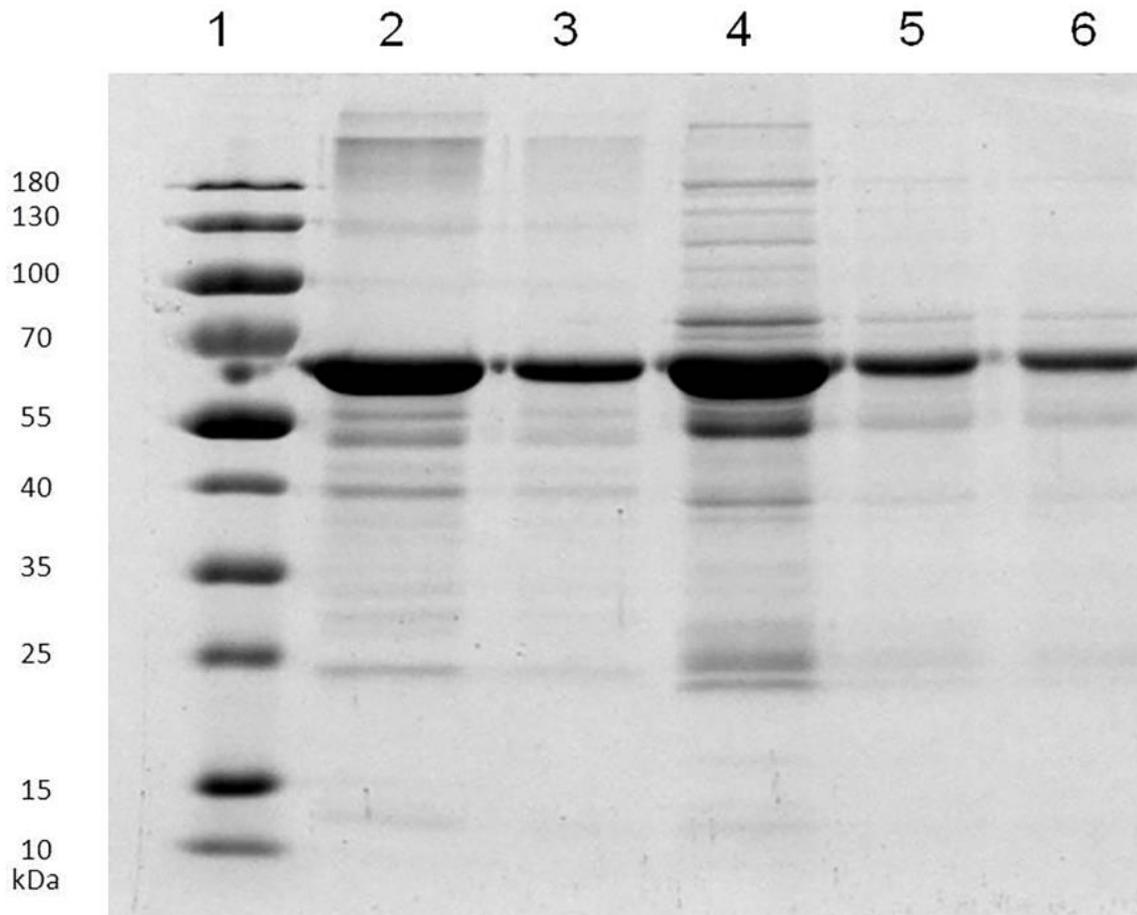


Figura 11. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas a suero humano por 24 h

Carril 1, Marcadores moleculares de proteínas. Carril 2, BSA en solución (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Carril 3, Pastilla del tercer lavado de MBAuNPs-BSA. Carril 4, Suero humano. Carril 5, Pastilla de MBAuNPs expuestas 24 h a suero humano. Carril 6, Pastilla de MBAuNPs-BSA expuestas 24 h a suero humano.

Discusión

El recubrimiento de la superficie de las MBAuNPs con BSA, proteína sérica que evita la aglomeración de las MBAuNPs, puede dirigir las a tumores sólidos y propicia la acumulación de MBAuNPs en ellos (Brewer et al. 2005). En este trabajo reportamos por primera vez la caracterización exhaustiva de la CP que adquieren las MBAuNPs por exposición a BSA pura y a la HSA presente en el SH.

Se espera que la funcionalización con ligandos específicos que dirijan las MBAuNPs a los tejidos enfermos mejore la eficacia terapéutica cuando las NPs se administran sistémicamente mediante inyección intravenosa. Sin embargo, dicha funcionalización puede verse afectada e incluso anulada por la CP que se forma instantáneamente en la superficie, esto también se ha observado en las MBAuNPs funcionalizadas previamente con BSA para evitar su aglomeración. Las imágenes HRTEM muestran que las MBAuNPs-BSA lavadas extensivamente tienen una corona de 10-15 nm de espesor, ausente en las MBAuNPs puras, y que las moléculas de BSA parecen formar un tapiz de una o dos capas moleculares. El grosor de la capa de proteínas es consistente con las dimensiones (8×8×3.5 nm) de las moléculas de BSA nativa (He y Carter 1992).

El desplazamiento de 50 nm del pico de absorbancia observado por nosotros, de 775 nm en MBAuNPs a 825 nm en MBAuNPs-BSA, es sensiblemente mayor que el desplazamiento de 7 nm descrito por Nghiem et al. (2010). Esta diferencia puede deberse al número inicial de moléculas de BSA unidas por nanopartícula, ya que nosotros encontramos que la magnitud del desplazamiento del espectro UV-VIS depende de la concentración inicial de BSA utilizada para la funcionalización.

Nuestra estimación matemática del área superficial de cada MBAuNPs y del número de moléculas de BSA unidas a la superficie coincide con el número de moléculas de BSA determinadas por espectrofotometría UV. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las imágenes HRTEM, el aumento del diámetro hidrodinámico, la estimación matemática del área de la superficie y los resultados de la cuantificación experimental, concluimos que la CP de las MBAuNPs-BSA tiene dos partes: la interna, de una o dos capas de moléculas de BSA unidas covalentemente a la superficie de cada MBAuNP y la externa laxa, formada por

moléculas de BSA aglomeradas y unidas por enlaces no covalentes, que se liberan con lavado extensivo. Este modelo es consistente con el de Kokkinopoulou et al. (2017), quienes propusieron que la CP consta no solo de las capas de proteínas que cubren cada NP, sino también de una red tridimensional de proteínas unidas a su superficie.

Brewer et al. (2005) estimaron que el número de moléculas de BSA unidas a AuNPs esféricas oscila entre 2.0×10^{12} y 3.3×10^{12} por cm^2 , dependiendo de la orientación en la que se une la BSA a la NP. En este contexto, y asumiendo que el área de cada molécula de BSA es de 28 nm^2 , obtuvimos un intervalo similar de moléculas de BSA por cm^2 : 3.5×10^{12} . Esta cuantificación puede aplicar tanto para las semillas áuricas como para las MBAuNPs.

Para calcular el área superficial total disponible para la unión de las moléculas de BSA que formarían la CP dura de cada MBAuNPs utilizamos la Ecuación 3. Utilizamos la Ecuación 4, ligeramente modificada de la Ecuación 3, para calcular el área disponible para formar la CP blanda. En el caso del área superficial, nuestros resultados fueron similares a los de Tsoulos et al. (2017) y consistentes con el número de moléculas de BSA unidas a la superficie de Au estimado por Brewer et al. (2005).

NPs con potencial $\zeta \geq +30$ o ≤ -30 se consideran estables (Dukhin y Xu 2020); nuestras semillas esféricas (potencial $\zeta = -36.8 \text{ mV}$) son bastante estables y no se aglomeran durante meses, mientras que las MBAuNPs (ζ -potencial = -24.4 mV) tienden a aglomerarse. Dado que las MBAuNPs-BSA tienen un potencial $\zeta = -72.7 \text{ mV}$, confirmamos que la BSA disminuye la tendencia de las MBAuNPs a aglomerarse (Bhattacharjee 2016) y las convierte en un sistema estable.

Los análisis XPS de alta resolución permitieron determinar la presencia de enlaces C-S-Au entre las moléculas de BSA y los átomos de oro presentes en la superficie de las MBAuNPs (Wu et al. 2011); probablemente se forman específicamente enlaces de coordinación de disulfuro de cistina Au-S como los descritos por Wang et al. (2013). Cada molécula de BSA contiene 34 residuos de cisteína y un grupo tiol libre en Cys34 que probablemente está involucrado en la

unión covalente de BSA a la superficie del oro, lo que hace que el complejo MBAuNPs-BSA sea estable.

La evaluación de la estructura secundaria de la BSA en solución y unida a las MBAuNPs reveló una disminución en la proporción de α -hélices en la proteína funcionalizada. Los enlaces disulfuro son la forma principal del azufre en BSA, lo cual estabiliza las hélices α para mantener la estructura de la proteína. El análisis XPS indica que la unión de BSA a la superficie de las MBAuNPs se da a través de enlaces S-Au que puede verse reflejado en la disminución de las hélices α . Se han descrito cambios similares en la estructura secundaria de la proteína (Wang et al. 2013, 2015), pero aún no sabemos si estos cambios afectan la afinidad de la BSA por el dominio de unión a ciertos receptores celulares ubicados en la superficie de las células endoteliales y de algunas células cancerosas (Merlot et al. 2014).

También encontramos que la exposición de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA a SH aumentó los valores del potencial ζ hasta valores cercanos a los de las MBAuNPs sin recubrimiento, y aumento de los valores de D_H de 25 nm para las MBAuNPs y 47 nm para las MBAuNPs-BSA. Estos efectos pueden explicarse por la presencia de moléculas del SH distintas a BSA o HSA.

Además, caracterizamos los patrones electroforéticos de las proteínas unidas a MBAuNPs y MBAuNPs-BSA expuestas al SH, mediante los cuales determinamos la unión de HSA y otras proteínas no identificadas, con pesos moleculares aparentes de 180, 156, 120, 84, 75 y 25 kDa, unidas tanto a MBAuNPs como a MBAuNPs-BSA y suponemos que la unión de estas proteínas determina el aumento del potencial ζ y el D_H .

El uso de las MBAuNPs en aplicaciones médicas depende en gran medida de la entrega exitosa de fármacos a sus blancos biológicos a través del control fino y el ajuste de la CP, un proceso que requiere investigaciones interdisciplinarias por equipos de oncólogos/biólogos moleculares/físicos. En este contexto, planeamos identificar las proteínas que forman la CP de las MBAuNPs expuestas a SH para explorar si ellas afectarían la interacción de las MBAuNPs o determinan biocompatibilidad con las células diana.

IV. Péptidos afines a células MDA-MB-231 y HeLa, desplegados por clonas del fago M13KE

Los métodos actuales para la detección temprana del cáncer y el desarrollo de tratamientos eficaces son una prioridad en el desarrollo de nuevas técnicas en medicina. Por esta razón la identificación de ligandos de tumores, específicos o de alta afinidad, es un área de investigación en expansión (Brown 2010).

Para generar MBAuNPs recubiertas con péptidos que puedan dirigirlas específicamente a células tumorales, decidimos identificar péptidos con afinidad a la superficie de células de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama y de la línea HeLa de cáncer cervicouterino, mediante la técnica de despliegue en fagos (Smith 1985).

Despliegue en fagos

La técnica de despliegue en fagos emplea los bacteriófagos filamentosos M13, fd y f1 de *Escherichia coli* como vehículos para expresar diversas proteínas o secuencias peptídicas añadidas a la superficie de las proteínas de la cubierta de los viriones (Smith 1985). Esta tecnología ha tenido auge en inmunología, biología celular, farmacología y desarrollo de fármacos, como una poderosa herramienta para identificar y caracterizar las interacciones de polipéptidos recombinantes con sus blancos. Su aplicación potencial incluye la identificación de moléculas terapéuticas, epítomos con potencial inmunogénico para el desarrollo de vacunas y la búsqueda de péptidos o anticuerpos bloqueadores (Smith y Petrenko 1997).

Los bacteriófagos ('fagos') empleados para el despliegue de péptidos son virus que infectan una variedad de células de bacterias Gram negativas con pelos ('pili') que les sirven como receptores y a través de los cuales introducen su material genético. El fago más utilizado es M13, cuyo genoma es ADN circular de cadena sencilla de 8 kb con 11 genes. Una partícula fágica viable contiene 2,700 copias de la proteína 8 (pVIII) y solamente 3-5 copias de la proteína 3 (pIII) en su conformación

estructural. Ambas proteínas son las de elección para expresar, en fusión con otros genes, proteínas recombinantes de interés (Smith y Petrenko 1997).

Los fagos filamentosos no son líticos, pero inducen un estado en el que la bacteria infectada tiene la división celular atenuada y produce y libera partículas virales. En la primera división celular se producen unas 1,000 partículas y en las divisiones subsecuentes de 100 a 300 partículas virales (Smith y Petrenko 1997), que son exportadas a través de la membrana celular. Este fenómeno es ventajoso porque facilita la obtención y purificación de partículas virales asociadas a metodologías de ingeniería genética (Stricker y Li 2001), así como la inclusión de péptidos etiqueta mediante cromatografía de afinidad (Smith y Petrenko 1997; Stricker y Li 2001).

Identificación de péptidos con alta afinidad por células blanco a partir de bibliotecas combinatorias

El despliegue en fagos se ha utilizado ampliamente *in vitro* y en modelos animales para generar ligandos e identificar blancos relevantes para el cáncer (Krag et al. 2006). Las bibliotecas combinatorias, tales como las bibliotecas de péptidos en bacteriófagos, son un recurso de ligandos potenciales para diversos blancos moleculares relacionados con el cáncer (Krumpe y Mori 2006). Las técnicas más comunes se basan en el uso de bibliotecas combinatorias del bacteriófago filamentosos M13 (Fatemi et al. 2017).

Los péptidos son moléculas pequeñas que pueden dirigirse específicamente a las células cancerosas y subsanar ciertas complicaciones que tiene el uso de otras moléculas como los anticuerpos, que tienen limitaciones sobre todo por su tamaño (Watt 2006). Los péptidos específicos se consideran fragmentos de moléculas que se dirigen al blanco con eficacia potencial para mejorar el tratamiento clínico actual de tumores (Li et al. 2020). Sin embargo, solo una pequeña parte de los péptidos desarrollados en terapias clínicas son dirigidos al cáncer (Krumpe y Mori 2006).

Un objetivo central en el campo de la focalización molecular es encontrar nuevos péptidos dirigidos al cáncer, los cuales pueden identificarse eficazmente mediante selecciones de afinidad utilizando bibliotecas de péptidos aleatorios

complejos que contienen millones de péptidos desplegados en bacteriófagos (Landon y Deutscher 2003).

El despliegue en fagos se ha utilizado para identificar péptidos de alta afinidad a la superficie de células de cáncer de mama (Galbiati et al. 2016; Nobrega et al. 2016; Jin et al. 2021), cáncer cervicouterino (Li et al. 2017), cáncer colorrectal (Rasmussen et al. 2002), cáncer de próstata (Yeh et al. 2016) y hepatocarcinoma (Du et al. 2010).

Pocos trabajos han reportado el uso de estos péptidos para recubrir NPs, a pesar de que se ha demostrado el aumento en la captación y especificidad celular de las NPs funcionalizadas con péptidos, por ejemplo, para mejorar la administración de fármacos específicos al cerebro. Li et al. (2011) funcionalizaron NPs basadas en polietilenglicol-poliácido láctico-co-glicólico con un péptido seleccionado *in vivo* en ratones a los cuales se les administró una alícuota de fagos de la biblioteca de péptidos Ph.D.-12TM. Después de cuatro rondas de tamizaje se seleccionó un péptido y se conjugó a las NPs. El nano-conjugado NPs-péptido probado en células endoteliales de cerebro de ratón inmortalizadas permitió una captación significativamente mayor cuando las NPs eran recubiertas con el péptido que con las NPs no recubiertas. Además, en ensayos *in vivo* se mostró gran selectividad cerebral, ya que se observó mayor eficiencia de acumulación en el cerebro, con menor acumulación en el hígado y el bazo en los ratones inyectados por vía intravenosa con NPs conjugadas con el péptido que con NPs sin recubrir.

Estos estudios han concluido que dichos péptidos tienen gran potencial para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos del cáncer.

Justificación

El cáncer de mama tiene altas tasas de incidencia y mortalidad en mujeres (Jin et al. 2021), y el cáncer cervicouterino es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo (Xiao et al. 2019).

La práctica clínica actual necesita urgentemente el desarrollo de nuevos enfoques para el diagnóstico y tratamiento de los cánceres de mama y cervicouterino. Un enfoque promisorio es la búsqueda de moléculas como los

péptidos que se unan con alta afinidad a las células cancerosas para recubrir NPs con ellas y aumentar la eficacia de los tratamientos en nanomedicina.

En este capítulo presentamos los resultados del tamizaje de clonas del fago M13KE que despliegan dodecapéptidos en la proteína pIII que se unen a componentes de la superficie de las células MDA-MB-231 de cáncer de mama y HeLa de cáncer cervicouterino.

Material y métodos

Cultivos de las líneas MDA-MB-231 y HeLa

Células de la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama humano y de la línea HeLa de cáncer cervicouterino adquiridas de ATCC fueron cultivadas en cajas de Petri de 3 cm y mantenidas en medios DMEM y L15, respectivamente, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Los medios fueron suplementados con suero fetal bovino al 10%. Los tamizajes de la biblioteca de fagos M13KE se llevaron a cabo en cultivos confluentes.

Tamizaje de la biblioteca de fagos M13KE

De las cajas con cultivos confluentes se retiró el medio y se lavaron tres veces con PBS estéril. La superficie celular fue bloqueada con BSA al 3% en solución salina amortiguada con Tris-HCl, pH 7.4 (TBS) y mantenida 1 h a 37 °C con agitación. La solución bloqueadora fue descartada e inmediatamente después se hicieron tres lavados con TBS. Se usaron 10 µL de la biblioteca original de péptidos (10¹¹ fagos) diluida en 1,990 mL de TBS (1:200). Se adicionó todo el volumen a las cajas con células MDA-MB-231 o HeLa, que luego se incubaron 1 h a 37 °C con agitación. Al término de este tiempo el sobrenadante fue recuperado y las cajas se lavaron cuatro veces con TBS-Tween 20 al 0.3%. Para eluir los fagos a cada caja se añadió 1 mL de glicina 0.2 M pH 2.2, que se mantuvo 10 min a temperatura ambiente. Después se recuperó todo el eluido, que se neutralizó por adición de 125 µL de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Los fagos recuperados en la primera ronda de tamizaje fueron recuperados, amplificados y titulados. Después se realizaron tres rondas adicionales de unión/amplificación, aumentando sucesivamente la concentración de Tween 20 en la solución de lavado en cada ronda (TBS-Tween 20 al 0.5%, 0.7% y 0.9%). Se

alternó el uso de BSA en cada ronda de tamizaje para no enriquecer la selección de clonas que se unen a esta proteína.

Ligandos peptídicos que se unen a la superficie de células MDA-MB-231 o HeLa desplegados en clonas del fago M13KE

Para seleccionar dodecapéptidos con alta afinidad a la superficie de células MDA-MB-231 y HeLa llevamos a cabo el escrutinio de una biblioteca de dodecapéptidos aleatorios desplegados en fagos filamentosos M13KE (PhD12, New England Biolabs).

Enfrentamos cultivos de células MDA-MB-231 o HeLa a la biblioteca de fagos en cuatro pasos sucesivos, con lavados cada vez más astringentes, para descartar los fagos no unidos y seleccionar los fagos que fueron eluidos después de haberse unido a la superficie celular. Los fagos eluidos en la primera ronda se amplificaron por reinfección en *E. coli* ER2738 y se sometieron a una segunda ronda de tamizaje a través de ciclos adicionales de unión/amplificación para enriquecer el conjunto con mayor afinidad a la superficie de las células blanco. Después de cuatro rondas, las clonas individuales de fagos se caracterizaron mediante amplificación del ADN fágico por PCR seguida de secuenciación.

Amplificación de fagos tamizados

Después de cada ronda de tamizaje los fagos fueron amplificados en células de *E. coli* ER2738. A la suspensión de fagos se añadió un volumen igual de suspensión de células de *E. coli* ER2738 y la mezcla se incubó 30 min a 37 °C, pasados los cuales se añadieron 2 mL de la suspensión de células de *E. coli* ER2738 no infectadas y la suspensión de células infectadas a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo LB estéril y la mezcla se incubó toda la noche con agitación a 37 °C.

El contenido del matraz fue luego repartido en 12 tubos de 50 mL que se centrifugaron a 6,000 rpm por 30 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y mezclados con PEG 20%/NaCl 2.5 M; la mezcla resultante se dejó reposar toda la noche a 4 °C y después se centrifugó 1 h a 6,000 rpm. Las pastillas que contenían los fagos fueron resuspendidas con TBS estéril y las bacterias remanentes fueron

retiradas por centrifugación durante 10 min a 13,000 rpm. Las suspensiones con fagos fueron almacenadas a 4 °C hasta la siguiente ronda de tamizaje.

Titulación de los fagos

Diez- μ L de mezcla con fagos amplificados se añadieron a 990 μ L de TBS estéril y se realizaron diluciones seriadas 1:100, en las que 10 μ L de la mezcla previa se añadían a 990 μ L de TBS (desde 10^{-2} hasta 10^{-10}). De cada dilución se tomaron 10 μ L para infectar 200 μ L de una suspensión de células de *E. coli* ER2738 y la mezcla se incubó a 37 °C por 30 min. Se añadieron luego 2 μ L de IPTG 200 mM y 20 μ L de X-Gal 100 mM en dimetilformamida. Las colonias individuales de *E. coli* ER2738 que portan fagos con insertos se tornan azules por la hidrólisis de X-Gal. Las mezclas fueron diluidas con 2.5 mL de medio Top LB y vertidas en cajas de Petri con agar LB que fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de las placas azules para titular los fagos.

Selección de las clonas de fagos

Los fagos resultantes de la cuarta ronda de tamizaje se titularon directamente con la técnica mencionada, pero sin amplificación previa. Las clonas azules fueron recuperadas con puntas de micropipeta estériles y cada una fue almacenada a 4 °C en 100 μ L de TBS estéril. Los fagos de cada clona fueron añadidos a 800 μ L de una suspensión de células de *E. coli* ER2738 y las mezclas se incubaron 2 h a 37 °C. Una alícuota de 200 μ L de cada clona fue luego amplificada en un cultivo de *E. coli* ER2738 con 5 mL de caldo por incubación bajo agitación durante toda la noche a 37 °C.

Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de viriones de fagos de la cuarta ronda de tamizaje

Una alícuota de 10 μ L de los fagos recuperados de la cuarta ronda de tamizaje fue sujeta a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Se mezclaron 10 μ L de la suspensión de fagos de cada clona con 10 μ L del amortiguador de Laemmli (2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0.004%, glicerol al 20%, SDS al 4%, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8). Los tubos con las mezclas se sumergieron 5 min en agua hirviendo. Se aplicaron 20 μ L de cada mezcla a los carriles del gel de SDS-

poliacrilamida al 12% y se corrieron 2 h a 120 V. El gel se tiñó con azul de Coomassie por 30 min y se destiñó toda la noche en una mezcla de metanol-agua-ácido acético glacial 5:4:1.

Secuenciación del ADN de las clonas positivas

Para extraer el ADN de los fagos clonados, 1.5 mL de la suspensión de células infectadas fue centrifugada 3 min a 8,000 rpm. El sobrenadante fue descartado, la pastilla fue resuspendida en 100 μ L de Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH 8.0 (TE) y se dejó reposar 5 min en hielo. Después se añadieron 200 μ L de SDS al 1%-NaOH 0.2 N y la mezcla se dejó reposar 10 min en hielo, al cabo de los cuales se añadieron 150 μ L de ácido acético/acetato de sodio 3M pH 5.2, se dejó reposar 10 min en hielo y se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, al que se añadieron 5 μ L de ARNasa (9 ng/mL) y se incubó 10 min a 37 °C. Después se añadieron 300 μ L de isopropanol y se dejó reposar 30 min en hielo. Se centrifugó 20 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó evaporar el isopropanol a 65 °C y el precipitado se disolvió con 50 μ L de agua MilliQ estéril. El ADN se cuantificó por espectrofotometría, se empleó para los ensayos de PCR y los productos de amplificación de las clonas se secuenciaron.

Resultados

Después de cuatro rondas consecutivas de tamizaje, las partículas fágicas unidas a las células cancerosas fueron liberadas por elución y empleadas para infectar células de *E. coli* ER2738 sembradas en cajas de agar LB suplementado con IPTG y X-Gal.

Con la dilución 10^{-4} de los lisados de una placa de células infectadas obtuvimos alrededor de 70 clones azules en la cuarta ronda de tamizaje con las células MDA-MB-231 (Figura 12). Con la dilución 10^{-2} obtuvimos aproximadamente 100 clones azules del tamizaje en células HeLa. De la ronda final de cada tamizaje con cada línea celular recuperamos aleatoriamente 30 clones de fagos para propagarlas y caracterizarlas.

El ADN extraído de cada clona fue secuenciado para identificar los 36 pares de bases que codifican los dodecapéptidos correspondientes. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación (Tabla 5) flanquean un segmento de 336 pares de bases que incluye la secuencia espaciadora de 300 pares de bases, dentro de la cual se inserta el segmento de nucleótidos que codifica el dodecapéptido correspondiente (Li et al. 2017).

Para asegurarnos de que los oligonucleótidos funcionan adecuadamente, amplificamos por PCR el ADN aislado de cada clona utilizando como control positivo una clona del fago MK13 de la biblioteca original, cuyo genoma contiene la secuencia espaciadora de 300 pares de bases sin el inserto de 36 pares de bases que codifica el dodecapéptido. La Figura 13 muestra el electroferograma de un gel de agarosa con ADN amplificado de clones fágicas con insertos, que generan bandas de 336 pares de bases.

También analizamos las proteínas de los viriones de las clones fágicas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, para asegurarnos que contienen la proteína 8, la principal proteína estructural del fago M13 (Sidhu 2001). En los geles observamos la banda proteínica ligeramente menor a 10 kDa (Figura 14), esperada para la proteína 8.

En las 30 clones seleccionadas del tamizaje con células MDA-MB-231 obtuvimos 27 secuencias nucleotídicas que codifican los dodecapéptidos

correspondientes (Tabla 6). Cuatro de estas secuencias (FKQDAWEAVDIR, SLQTLRLGHNTS, ADSGRTTSKTSY y DSSPRMWPNRIT) aparecieron duplicadas. En ellas identificamos dos motivos peptídicos, que denominamos Consenso 1 (GTGFSSLRYRTLNM) y Consenso 2 (PVNNAGLTRTTSS), respectivamente (Tablas 7 y 8).

Del tamizaje con células HeLa también obtuvimos 27 secuencias codificantes de dodecapéptidos, entre las cuales se repitieron dos: FKQDAWEAVDIR (seis veces) y TMNDWNTNKSSF (tres veces) (Tabla 9). Entre todas ellas identificamos el motivo peptídico QDAWEAVDIR (Tabla 10).

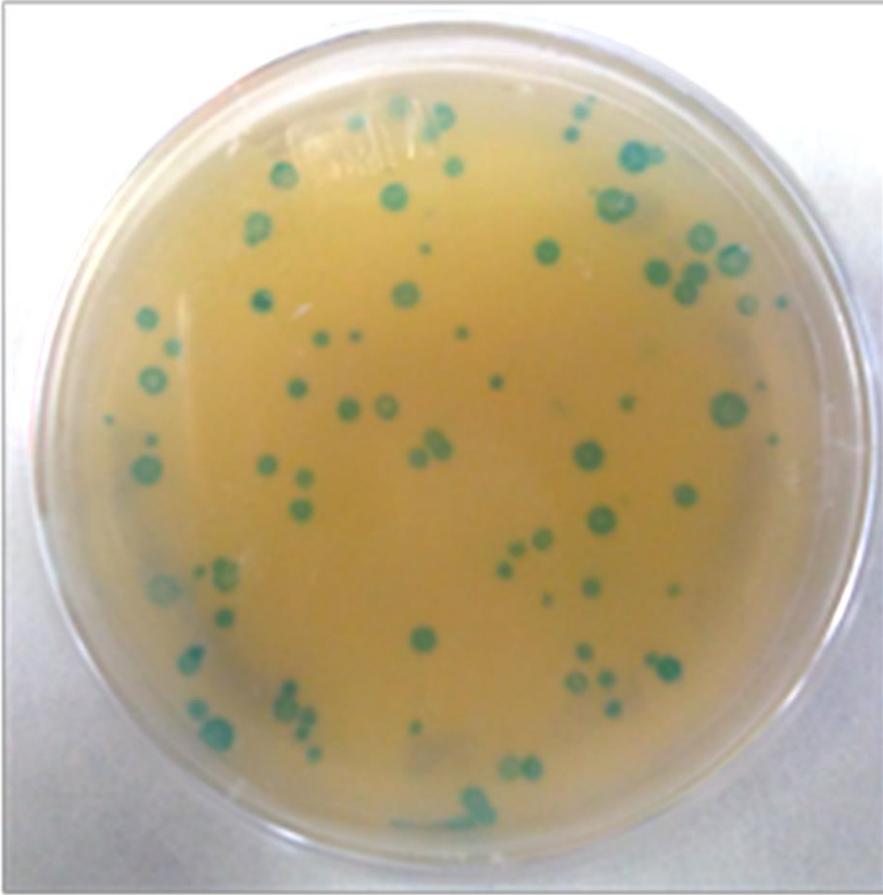


Figura 12. Colonias de *E. coli* ER2738 infectadas (azules), de las cuales obtuvimos las 30 clonas del fago M13KE en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231

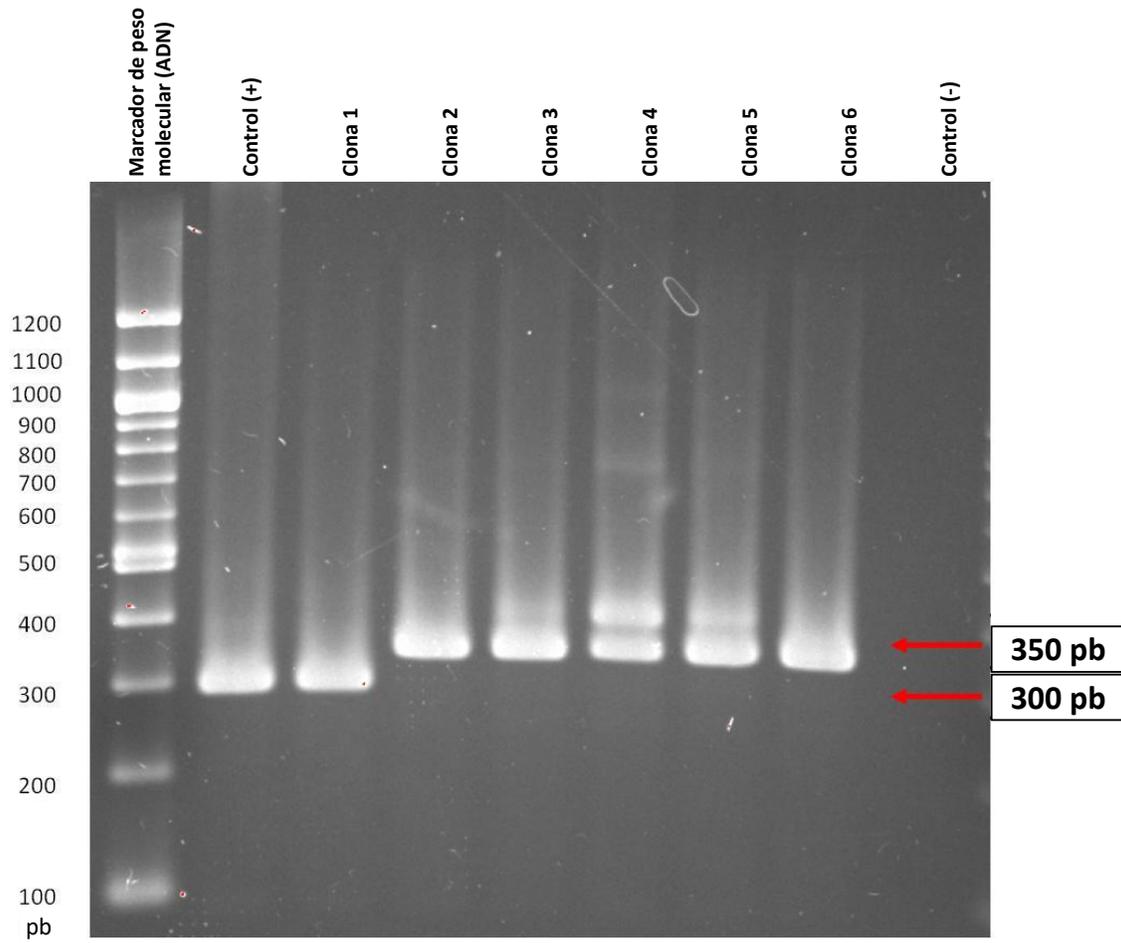


Figura 13. Electroferograma que ejemplifica los amplicones generados en mezclas de PCR de las clonas obtenidas en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231

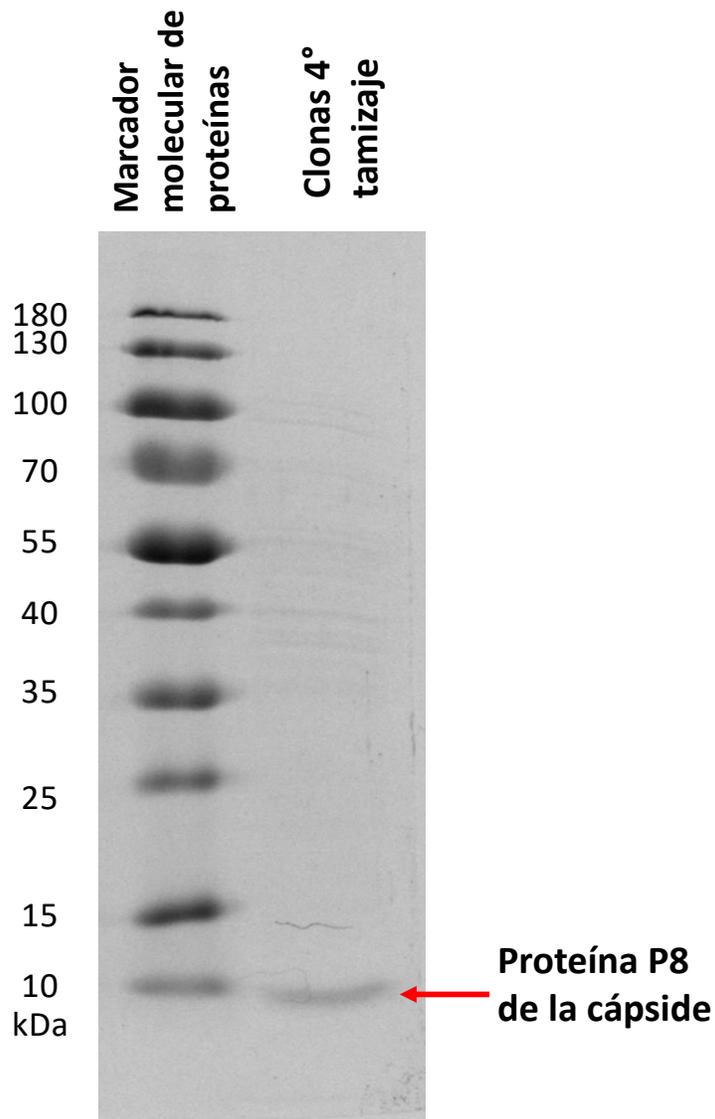


Figura 14. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de los viriones de una clona recuperada en la cuarta ronda de tamizaje con células MDA-MB-231

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia espaciadora con los insertos que codifican los dodecapéptidos en la biblioteca de M13KE

Nombre	Secuencia (5'→3')
M13KE-Ext01	TTGTCATTGTCGGCGCAACT
M13KE-EXt02	GCATTCCACAGACAGCCCTC

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de las 27 clonas de fagos obtenidas del tamizaje con células MDA-MB-231

Clona	Secuencias de aminoácidos*											
1	S	I	T	T	K	G	W	I	G	P	G	M
2	I	L	G	R	L	S	L	V	E	Y	R	H
3	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
4	S	V	D	H	K	W	K	T	G	N	N	G
5	R	N	Y	T	P	V	D	H	S	G	G	Q
6	W	T	Q	T	W	I	N	M	S	P	H	M
7	S	L	Q	T	L	R	L	G	H	N	T	S
8	S	N	A	R	L	L	T	A	S	N	V	Y
9	L	P	V	N	N	Y	G	H	S	G	T	T
10	G	T	E	K	V	N	V	A	K	W	T	R
11	N	L	N	F	Q	K	Y	N	K	L	N	M
12	T	G	D	L	S	L	F	L	R	K	L	N
13	Q	E	P	H	S	I	F	G	L	Q	I	N
14	E	G	L	T	E	H	G	Y	A	Y	P	T
15	A	D	S	G	R	T	T	S	K	T	S	Y
16	D	F	G	G	F	S	R	N	R	M	M	T
17	D	S	S	P	R	M	W	P	N	R	I	T
18	D	G	G	S	G	F	S	W	Q	K	Y	G
19	N	F	G	Q	I	K	F	S	Q	Y	R	H
20	A	D	S	G	R	T	T	S	K	T	S	Y
21	S	L	G	M	K	T	H	Q	I	S	L	R
22	Q	M	Y	M	K	D	N	S	R	N	V	P
23	W	H	F	D	K	S	R	T	L	N	T	N
24	S	L	Q	T	L	R	L	G	H	N	T	S
25	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
26	D	S	S	P	R	M	W	P	N	R	I	T
27	V	D	I	K	S	H	F	S	H	T	G	K

Las secuencias resaltadas en verde son las que aparecen más de una vez

Tabla 8. Secuencias peptídicas consenso 2 del tamizaje con células MDA-MB-231

						V	D	I	K	S	H	F	S	H	T	G	K				
					S	V	D	H	K	W	K	T	G	N	N	G					
	R	N	Y	T	P	V	D	H	S	G	G	Q									
R					P	V	N	R	S	N	D	K	M	Y	M	Q					
				L	P	V	N	N	Y	G	H	S	G	T	T						
					S	T	N	H	G	L	R	L	T	Q	L	S					
								A	D	S	G	R	T	T	S	K	T	S	Y		
						M	G	P	G	I	W	G	K	T	T	I	S				
		G	T	E	K	V	N	V	A	K	W	T	R								
R					Y	V	N	S	A	T	L	L	R	A	N	S					
		F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R								

Los aminoácidos resaltados en verde son los que forman el consenso:
PVNNA~~GL~~TRTTSS

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de las 27 clonas de fagos obtenidas del tamizaje con células HeLa

Clona	Secuencias*											
1	D	S	S	P	R	M	W	P	N	R	I	T
2	F	F	N	S	S	N	V	N	V	N	N	D
3	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
4	V	P	F	N	V	V	Y	P	R	V	I	E
5	T	M	Q	D	W	N	E	N	K	S	S	F
6	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
7	N	I	V	S	W	Y	D	S	Q	R	P	R
8	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
9	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
10	N	E	S	G	I	T	R	I	A	L	Q	D
11	M	P	L	R	Y	P	T	Q	V	T	L	D
12	F	N	Q	D	A	W	E	A	G	D	I	R
13	H	N	R	K	G	W	K	A	S	E	I	K
14	L	S	S	E	F	D	T	K	Q	S	G	Q
15	G	E	W	R	A	R	I	D	Q	D	V	S
16	S	V	D	Q	D	I	R	A	R	W	E	G
17	S	L	Q	T	L	R	L	G	H	N	T	S
18	V	D	I	K	S	H	F	S	H	T	G	K
19	F	K	Q	D	A	W	E	A	V	D	I	R
20	Q	A	Q	D	K	R	V	P	R	D	I	W
21	W	I	D	R	P	V	R	K	D	Q	A	Q
22	F	L	S	G	C	G	G	T	A	E	A	T
23	T	Y	P	Y	N	L	Q	V	R	H	W	T
24	D	Q	Q	D	A	W	E	A	K	D	I	R
25	T	M	N	D	W	N	T	N	K	S	S	F
26	T	M	N	D	W	N	T	N	K	S	S	F
27	T	M	N	D	W	N	T	N	K	S	S	F

Las secuencias resaltadas en verde son las que aparecen más de una vez

Discusión

La búsqueda e identificación de biomoléculas con aplicaciones médicas ha tenido un gran avance desde la aparición de la tecnología de despliegue en fagos. Con el propósito de funcionalizar en el futuro MBAuNPs con péptidos con alta afinidad a la superficie de células de cáncer de mama y de cáncer cervicouterino llevamos a cabo el escrutinio de una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en el fago filamentoso M13 para seleccionar los que se unan específicamente a la superficie de las células de ambas líneas.

Llevamos a cabo el tamizaje enfrentando las células blanco (MDA-MB-231 o HeLa) a la biblioteca en pasos sucesivos con lavados cada vez más astringentes, para descartar los fagos no unidos y seleccionar los eluidos que estaban unidos a la superficie celular. Los fagos eluidos fueron amplificados y sometidos a una segunda ronda de tamizaje a través de ciclos adicionales de unión/amplificación para enriquecer el conjunto a favor de las secuencias de unión. Después de cuatro rondas, las clonas de fagos fueron se caracterizaron por secuenciación del ADN.

El vector de clonación M13KE, a diferencia del vector parental, tiene insertada la secuencia del operón *LacZ* que permite identificar, mediante alfa complementación en presencia de IPTG y X-gal, las células infectadas (de color azul debido a la hidrólisis de X-gal) (Figura 12). Después de cada ronda la biblioteca se amplificó y se titularon los fagos de la progenie para determinar los que debían añadirse en cada tamizaje sucesivo, que fueron 1×10^{11} .

Al cabo de las cuatro rondas de tamizaje seleccionamos 30 clonas de fagos con partículas virales de alta afinidad a la superficie de las células blanco y obtuvimos la secuencia nucleotídica de los insertos codificantes de los dodecapéptidos de todas las clonas. Secuenciamos 27 clonas resultantes del tamizaje con cada línea de células blanco y en ellas identificamos dos motivos peptídicos consenso para las células MDA-MB-231 (GTGFSSLRYRTLNM y PVNNAGLTRTTSS) y un motivo consenso para las células HeLa (QDAWEADIR).

Varias secuencias aparecieron repetidamente, lo que sugiere que los dodecapéptidos correspondientes son los de mayor afinidad por las células blanco. Además, de estas secuencias repetidas, la del dodecapéptido FKQDAWEAVDIR

apareció en tamizajes independientes con ambas líneas celulares. Este dodecapéptido podría utilizarse para dirigir las MBAuNPs a las dos líneas celulares.

Para proponer con mayor certidumbre los dodecapéptidos adecuados para funcionalizar las MBAuNPs debe evaluarse su afinidad por las células blanco y realizar análisis bioinformáticos para explorar sus blancos moleculares e inmunoensayos, para luego sintetizarlos y proceder a la funcionalización y ensayo de las MBAuNPs para la ablación fototérmica experimental sobre células MDA-MB-231 y HeLa.

V. Discusión general

En este trabajo desarrollamos un método de síntesis de MBAuNPs potencialmente útiles para inducir hipertermia por irradiación láser en el infrarrojo cercano con potencia mínima, evaluamos su uso terapéutico potencial en geles que constituyen un modelo de la piel, analizamos la corona proteínica que adquieren las MBAuNPs por exposición a BSA y SH e identificamos dodecapéptidos generados en una biblioteca de despliegue en fagos con alta afinidad a componentes de la superficie de células de cáncer de mama y de cáncer cervicouterino.

Obtuvimos semillas áuricas esféricas estables, de características reproducibles, como señalan diversos autores (Turkevich et al. 1951; Frens 1973; Kimling et al. 2006). Una vez que desarrollamos un método para la síntesis de semillas áuricas y las caracterizamos (Carreón Alvarez 2016), desarrollamos un método para la síntesis de MBAuNPs a partir de suspensiones con concentraciones conocidas de semillas, verificamos que es confiable y reproducible y lo utilizamos para el resto del trabajo.

El siguiente paso fue la funcionalización, que consistió en el recubrimiento de las MBAuNPs con BSA, que evita la aglomeración. Encontramos que el arreglo de BSA sobre la superficie de las MBAuNPs funcionalizadas es un tapiz de una o dos capas moleculares de la proteína, pues las imágenes de HRTEM resuelven moléculas individuales de BSA con un perímetro ~ 5 nm y el espesor de la capa proteínica de la superficie es consistente con las dimensiones de la proteína nativa, de $8 \times 8 \times 3.5$ nm (He y Carter 1992).

Encontramos que la BSA se une a la superficie de las nanopartículas mediante enlaces covalentes de coordinación Au-S. Debido a que cada molécula de BSA contiene 34 residuos de cisteína y un residuo con un grupo tiol libre que corresponde a la cisteína 34; pensamos que este residuo está implicado en la unión covalente de la BSA a las MBAuNPs.

La corona de BSA consta de la parte interna 'dura' formada por una o dos capas de moléculas de proteínas unidas covalentemente a la superficie de las MBAuNPs y la parte externa 'blanda' más laxa, formada por la aglomeración de

moléculas de BSA unidas entre sí por enlaces no covalentes. Un hallazgo interesante es que la exposición de las MBAuNPs al suero humano hace que la corona de proteínas sea más abundante y diversa.

La combinación de 6.2×10^9 MBAuNPs/mL con una intensidad óptica de 0.75 W/cm^2 parece apropiado para la ablación térmica de tumores pues provocó un aumento de temperatura local de hasta $4.8 \text{ }^\circ\text{C}$ con una intensidad óptica menor a 1 W/cm^2 en los geles phantom, que supera los incrementos de temperatura obtenidos en trabajos previos (Gannon et al. 2008; Liu et al. 2010; Munireddy et al. 2012; Li et al. 2013).

Con el propósito de funcionalizar las MBAuNPs con péptidos que se unan a la superficie de células cancerosas con alta afinidad y especificidad, enfrentamos células de una línea de cáncer de mama y otra de cáncer cervicouterino cultivadas en superficie a una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos desplegados en fagos M13KE. Al cabo de cuatro rondas de tamizaje seleccionamos 30 clonas de fagos con partículas virales de alta afinidad para cada línea celular y obtuvimos las secuencias nucleotídicas de todas las clonas de interés. Secuenciamos 27 clonas de fagos para cada línea celular, e identificamos dos motivos consenso para las células de cáncer de mama (GTGFSSLRRTLNM y PVNNAGLTRTTSS) y un motivo consenso para las células de cáncer cervicouterino (QDAWEAVDIR); además identificamos una secuencia peptídica (FKQDAWEAVDIR) que apareció en los tamizajes con ambas líneas celulares. Por lo tanto, ahora contamos con dodecapéptidos potencialmente útiles para la ablación fototérmica dirigida contra el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino que debemos analizar y ensayar para definir su utilidad real.

Nos proponemos continuar este trabajo para 1) identificar las probables moléculas con las que interactúan los péptidos con las secuencias consenso conocidas mediante técnicas bioinformáticas de dinámica molecular, 2) sintetizar los péptidos identificados para recubrir las MBAuNPs e incrementar su afinidad por las células MDA-MB-231 y HeLa y 3) realizar ensayos in vitro e in vivo para evaluar la idoneidad de las MBAuNPs para la ablación térmica de tumores.

VI. Referencias

- Allabashi R, Stach W, de la Escosura-Muñiz A, et al (2009) ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving. *J Nanoparticle Res* 11:2003–2011. doi: 10.1007/s11051-008-9561-2
- Barbosa S, Agrawal A, Rodríguez-Lorenzo L, et al (2010) Tuning Size and Sensing Properties in Colloidal Gold Nanostars. *Langmuir* 26:14943–14950. doi: 10.1021/la102559e
- Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, et al (2016) Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J Control Release* 235:205–221. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.062
- Bhattacharjee S (2016) DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release*
- Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, et al (2005) Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir* 21:9303–9307. doi: 10.1021/la050588t
- Brown K (2010) Peptidic Tumor Targeting Agents: The Road from Phage Display Peptide Selections to Clinical Applications. *Curr Pharm Des* 16:1040–1054. doi: 10.2174/138161210790963788
- Cabrera-Trujillo JM, Montejano-Carrizales JM, Rodríguez-López JL, et al (2010) Nucleation and growth of stellated gold clusters: Experimental synthesis and theoretical study. *J Phys Chem C* 114:21051–21060. doi: 10.1021/jp1068208
- Carreón Alvarez C de la L (2016) Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con seroalbúmina bovina para aplicaciones biomédicas. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Carretero-Palacios S, Mahboub O, Garcia-Vidal FJ, et al (2011) Mechanisms for extraordinary optical transmission through bull's eye structures. *Opt Express* 19:10429. doi: 10.1364/OE.19.010429
- Carrillo-Carrion C, Carril M, Parak WJ (2017) Techniques for the experimental investigation of the protein corona. *Curr. Opin. Biotechnol.*

- Chahat N, Zhadobov M, Alekseev S, Sauleau R (2012) Human skin-equivalent phantom for on-body antenna measurements in 60GHz band. *Electron Lett*. doi: 10.1049/el.2011.2619
- Cho S, Shin MH, Kim YK, et al (2009) Effects of Infrared Radiation and Heat on Human Skin Aging in vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14:15–19. doi: 10.1038/jidsymp.2009.7
- Corbo C, Molinaro R, Parodi A, et al (2016) The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine*
- Corbo C, Molinaro R, Tabatabaei M, et al (2017) Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications
- Cui M, Liu R, Deng Z, et al (2014) Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications. *Nano Res* 7:345–352. doi: 10.1007/s12274-013-0400-0
- Curry T, Kopelman R, Shilo M, Popovtzer R (2014) Multifunctional theranostic gold nanoparticles for targeted CT imaging and photothermal therapy. *Contrast Media Mol Imaging* 9:53–61. doi: 10.1002/cmml.1563
- Dai Z (2016) *Advances in Nanotheranostics I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, et al (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41:2740–2779. doi: 10.1039/C1CS15237H
- Du B, Han H, Wang Z, et al (2010) Targeted Drug Delivery to Hepatocarcinoma In vivo by Phage-Displayed Specific Binding Peptide. *Mol Cancer Res* 8:135–144. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0339
- Dukhin AS, Xu R (2020) Zeta-potential measurements. En: *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier, pp 213–224
- Espinosa A, Silva AKA, Sánchez-Iglesias A, et al (2016) Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Adv Healthc Mater* 5:1040–1048. doi: 10.1002/adhm.201501035
- Fatemi F, Amini SM, Kharrazi S, et al (2017) Construction of genetically engineered M13K07 helper phage for simultaneous phage display of gold binding peptide 1

- and nuclear matrix protein 22 ScFv antibody. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 159:770–780. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.034
- Fazal S, Jayasree A, Sasidharan S, et al (2014) Green Synthesis of Anisotropic Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy of Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* 6:8080–8089. doi: 10.1021/am500302t
- Ferrante C, Fortunati I, Molinaro I, Weber V (2015) BSA adsorption on gold nanoparticles investigated under static and flow conditions. En: 2015 International Conference on BioPhotonics (BioPhotonics). IEEE, pp 1–5
- Foroozandeh P, Aziz AA (2015) Merging Worlds of Nanomaterials and Biological Environment: Factors Governing Protein Corona Formation on Nanoparticles and Its Biological Consequences. *Nanoscale Res Lett*. doi: 10.1186/s11671-015-0922-3
- Frens G (1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat Phys Sci* 241:20–22. doi: 10.1038/physci241020a0
- Galbiati E, Gambini L, Civitarese V, et al (2016) ▪ Blind ▪ targeting in action: From phage display to breast cancer cell targeting with peptide-gold nanoconjugates. *Pharmacol Res* 111:155–162. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.007
- Gannon CJ, Patra C, Bhattacharya R, et al (2008) Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells. *J Nanobiotechnology* 6:2. doi: 10.1186/1477-3155-6-2
- Gao S, Zheng M, Ren X, et al (2016) Local hyperthermia in head and neck cancer; mechanism, application and advance. *Oncotarget* 7:. doi: 10.18632/oncotarget.10350
- García-Álvarez R, Hadjidemetriou M, Sánchez-Iglesias A, et al (2018) In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. the effect of their size and shape. *Nanoscale* 10:1256–1264. doi: 10.1039/c7nr08322j
- He XM, Carter DC (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. doi: 10.1038/358209a0
- Jiang L, Tang Y, Liow C, et al (2013) Synthesis of Fivefold Stellate Polyhedral Gold

- Nanoparticles with {110}-Facets via a Seed-Mediated Growth Method. *Small* 9:705–710. doi: 10.1002/sml.201202561
- Jin H, Gao X, Xiao L, et al (2021) Screening and identification of a specific peptide binding to breast cancer cells from a phage-displayed peptide library. *Biotechnol Lett* 43:153–164. doi: 10.1007/s10529-020-03044-3
- Kang S, Bhang SH, Hwang S, et al (2015) Mesenchymal Stem Cells Aggregate and Deliver Gold Nanoparticles to Tumors for Photothermal Therapy. *ACS Nano* 9:9678–9690. doi: 10.1021/acs.nano.5b02207
- Khan S, Gupta A, Verma NC, Nandi CK (2015) Kinetics of protein adsorption on gold nanoparticle with variable protein structure and nanoparticle size. *J Chem Phys* 143:164709. doi: 10.1063/1.4934605
- Kimling J, Maier M, Okenve B, et al (2006) Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. doi: 10.1021/jp061667w
- Kokkinopoulou M, Simon J, Landfester K, et al (2017) Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell-interactions. *Nanoscale* 9:8858–8870. doi: 10.1039/C7NR02977B
- Krag DN, Shukla GS, Shen G-P, et al (2006) Selection of Tumor-binding Ligands in Cancer Patients with Phage Display Libraries. *Cancer Res* 66:7724–7733. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4441
- Krumpe LRH, Mori T (2006) The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *Int J Pept Res Ther* 12:79–91. doi: 10.1007/s10989-005-9002-3
- Kruse DE, Stephens DN, Lindfors HA, et al (2011) A Radio-Frequency Coupling Network for Heating of Citrate-Coated Gold Nanoparticles for Cancer Therapy: Design and Analysis. *IEEE Trans Biomed Eng* 58:2002–2012. doi: 10.1109/TBME.2011.2124460
- Lal S, Clare SE, Halas NJ (2008) Nanoshell-Enabled Photothermal Cancer Therapy: Impending Clinical Impact. *Acc Chem Res* 41:1842–1851. doi: 10.1021/ar800150g
- Landon LA, Deutscher SL (2003) Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display. *J Cell Biochem* 90:509–517. doi:

10.1002/jcb.10634

- Lee YK, Choi EJ, Webster TJ, et al (2014) Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *Int. J. Nanomedicine*
- Li C, Gao N, Xue Q, et al (2017) Screening and identification of a specific peptide binding to cervical cancer cells from a phage-displayed peptide library. *Biotechnol Lett.* doi: 10.1007/s10529-017-2381-7
- Li C, Li J, Xu Y, et al (2020) Application of Phage-Displayed Peptides in Tumor Imaging Diagnosis and Targeting Therapy. *Int J Pept Res Ther* 1–9. doi: 10.1007/s10989-020-10108-5
- Li J, Feng L, Fan L, et al (2011) Targeting the brain with PEG–PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials* 32:4943–4950. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.031
- Li N, Zhao P, Astruc D (2014) Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angew Chemie Int Ed* 53:1756–1789. doi: 10.1002/anie.201300441
- Li Y, Brown RE, Martin RCG (2013) Incomplete thermal ablation of hepatocellular carcinoma: Effects on tumor proliferation. *J Surg Res* 181:250–255. doi: 10.1016/j.jss.2012.07.014
- Liu L-N, Xu H-X, Lu M-D, Xie X-Y (2010) Percutaneous ultrasound-guided thermal ablation for liver tumor with artificial pleural effusion or ascites. *Chin J Cancer* 29:830–835. doi: 10.5732/cjc.010.10095
- Liu Y, Chongsathidkiet P, Crawford BM, et al (2019) Plasmonic gold nanostar-mediated photothermal immunotherapy for brain tumor ablation and immunologic memory. *Immunotherapy* 11:1293–1302. doi: 10.2217/imt-2019-0023
- Maiorano G, Rizzello L, Malvindi MA, et al (2011) Monodispersed and size-controlled multibranching gold nanoparticles with nanoscale tuning of surface morphology. *Nanoscale* 3:2227. doi: 10.1039/c1nr10107b
- Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR (2014) Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Front Physiol* 5:. doi:

10.3389/fphys.2014.00299

- Miclaus T, Beer C, Chevallier J, et al (2016) Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms11770
- Mocan L, Matea C, Tabaran FA, et al (2017) Selective ex vivo photothermal nanotherapy of solid liver tumors mediated by albumin conjugated gold nanoparticles. *Biomaterials* 119:33–42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.12.009
- Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, et al (2011) Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc.* doi: 10.1021/ja107583h
- Munireddy S, Katz S, Somasundar P, Espat NJ (2012) Thermal tumor ablation therapy for colorectal cancer hepatic metastasis. *J Gastrointest Oncol* 69–77. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.008
- Nghiem THL, La TH, Vu XH, et al (2010) Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* doi: 10.1088/2043-6254/1/2/025009
- Nguyen VH, Lee B-JJ (2017) Protein corona: A new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine* 3137–3151. doi: 10.2147/IJN.S129300
- Nguyen VH, Meghani NM, Amin HH, et al (2018) Modulation of serum albumin protein corona for exploring cellular behaviors of fattigation-platform nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 170:179–186. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.060
- Nobrega FL, Ferreira D, Martins IM, et al (2016) Screening and characterization of novel specific peptides targeting MDA-MB-231 claudin-low breast carcinoma by computer-aided phage display methodologies. *BMC Cancer* 16:881. doi: 10.1186/s12885-016-2937-2
- Pederzoli F, Tosi G, Vandelli MA, et al (2017) Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*
- Peng Q, Wei X-Q, Yang Q, et al (2015) Enhanced biostability of nanoparticle-based drug delivery systems by albumin corona. *Nanomedicine* 10:205–214. doi:

10.2217/nnm.14.86

- Ramezani F, Rafii-Tabar H (2015) An in-depth view of human serum albumin corona on gold nanoparticles. *Mol Biosyst* 11:454–462. doi: 10.1039/C4MB00591K
- Rasmussen UB, Schreiber V, Schultz H, et al (2002) Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Ther* 9:606–612. doi: 10.1038/sj.cgt.7700476
- Rastinehad AR, Anastos H, Wajswol E, et al (2019) Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proc Natl Acad Sci* 116:18590–18596. doi: 10.1073/pnas.1906929116
- Ritz S, Schöttler S, Kotman N, et al (2015) Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. *Biomacromolecules*. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00108
- Sajanlal PR, Sreeprasad TS, Samal AK, Pradeep T (2011) Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Rev* 2:5883. doi: 10.3402/nano.v2i0.5883
- Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J (2003) Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19:228–234. doi: 10.1034/j.1600-0781.2003.00054.x
- Selva Sharma A, Ilanchelian M (2015) Comprehensive Multispectroscopic Analysis on the Interaction and Corona Formation of Human Serum Albumin with Gold/Silver Alloy Nanoparticles. *J Phys Chem B* 119:9461–9476. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b00436
- Senthil Kumar P, Pastoriza-Santos I, Rodríguez-González B, et al (2008) High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* 19:015606. doi: 10.1088/0957-4484/19/01/015606
- Sidhu SS (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng*. doi: 10.1016/S1389-0344(01)00087-9
- Siligardi G, Hussain R (2012) Albumin in drug delivery. *En: Serum Albumin: Structure, Functions and Health Impact*
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-) 228:1315–1317

- Smith GP, Petrenko VA (1997) Phage display. *Chem Rev.* doi: 10.1021/cr960065d
- Stricker N, Li M (2001) Phage Display Technologies. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
- Toraya-Brown S, Fiering S (2014) Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperth* 30:531–539. doi: 10.3109/02656736.2014.968640
- Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH (2015) Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol* 6:857–873. doi: 10.3762/bjnano.6.88
- Tsoulos T V., Han L, Weir J, et al (2017) A closer look at the physical and optical properties of gold nanostars: an experimental and computational study. *Nanoscale* 9:3766–3773. doi: 10.1039/C6NR09091E
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*
- Van de Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, et al (2011) Specific Cell Targeting with Nanobody Conjugated Branched Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy. *ACS Nano* 5:4319–4328. doi: 10.1021/nn1023363
- Wang L, Li J, Pan J, et al (2013) Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotron radiation-based techniques: Understanding the reduced damage in cell membranes. *J Am Chem Soc.* doi: 10.1021/ja406924v
- Wang P, Wang X, Wang L, et al (2015) Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. *Sci. Technol. Adv. Mater.*
- Watt PM (2006) Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds. *Nat Biotechnol* 24:177–183. doi: 10.1038/nbt1190
- Weissleder R (2001) A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 19:316–317. doi: 10.1038/86684
- Wu P, Bai P, Lei Z, et al (2011) Gold nanoparticles supported on functionalized mesoporous silica for selective oxidation of cyclohexane. *Microporous Mesoporous Mater.* doi: 10.1016/j.micromeso.2010.11.011
- Xiao L, Ma N, He H, et al (2019) Development of a novel drug targeting delivery

- system for cervical cancer therapy. *Nanotechnology* 30:075604. doi: 10.1088/1361-6528/aaf3f8
- Yeh C-Y, Hsiao J-K, Wang Y-P, et al (2016) Peptide-conjugated nanoparticles for targeted imaging and therapy of prostate cancer. *Biomaterials* 99:1–15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.015
- Yu S, Perálvarez-Marín A, Minelli C, et al (2016) Albumin-coated SPIONs: An experimental and theoretical evaluation of protein conformation, binding affinity and competition with serum proteins. *Nanoscale*. doi: 10.1039/c6nr01732k
- Yu Y, Luo Z, Teo CS, et al (2013) Tailoring the protein conformation to synthesize different-sized gold nanoclusters. *Chem Commun*. doi: 10.1039/c3cc46005c

VII. Artículos publicados y presentaciones en congresos

- Carreón-Álvarez, C., Sánchez-García, J. L., Sanabria-Ayala, V., Ortiz-Frade, L. A., García-Rodríguez, M. E., Rodríguez-López, J. L., & López-Revilla, R. (2020). Multibranched gold nanoparticles coated with serum proteins fit for photothermal tumor ablation. *AIP Advances*. <https://doi.org/10.1063/5.0025368>
- Alvarez, A., Carrillo Mercader, A., Gonzalez-Cruz, M., Carreon-Alvarez, C., Moran-Lazaro, J. P., & Tostado-Plascencia, M. M. (2021). Study of Linear Sweep Voltammetry in Tequila and Raicilla Samples. *ECS Transactions*. <https://doi.org/10.1149/10101.0025ecst>
- Tepale, N., Fernández-Escamilla, V. V. A., Carreon-Alvarez, C., González-Coronel, V. J., Luna-Flores, A., Carreon-Alvarez, A., & Aguilar, J. (2019). Nanoengineering of gold nanoparticles: Green synthesis, characterization, and applications. *Crystals*. <https://doi.org/10.3390/cryst9120612>
- Navarro Tovar G, Salado Leza D, Carreón-Álvarez C, Acosta-Ruelas BJ, & Rodríguez-López JL. CHAPTER 7. Surface Functionalization of Nanoparticles: Structure Determines Function. En: Grégory Guisbiers & Thomas Webster, eds. "Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Applications in Wound Healing and Infection Treatment" En prensa (Elsevier, verano 2021)



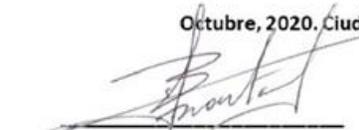
Otorga el presente

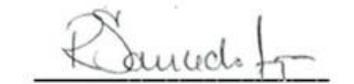
RECONOCIMIENTO

A **A. Carrillo Mercader, M. A. González Cruz,**
C. Carreón Álvarez, J. P. Moran, M. Tostado
Plascencia, M. A. Carreón A.

Por su participación como ponente en modalidad virtual con el trabajo titulado
“Estudio de la voltamperometría lineal en muestras de tequila y raicilla”

Octubre, 2020. Ciudad Juárez, Chihuahua. México.


Dr. Bernardo A. Frontana Uribe
Presidente del Comité Ejecutivo de la SMEQ
2019-2021


Dra. Rosa A. Saucedo Acuña
Presidente Comité Organizador del Congreso
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez





August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

This is to certify that Clara de la Luz Carreón Álvarez, José Luis Rodríguez López, Rubén López Revilla presented the contribution: **THERMAL ABLATION OF TUMORS BY ANISOTROPIC AUNPS FUNCTIONALIZED WITH BSA** as **Poster** modality, in the Materials for Medical Applications and Health Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,

Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President

4to SIMPOSIO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIA DE
MATERIALES



LA CIENCIA DE
MATERIALES Y
SUS APLICACIONES
EN EL ÁREA
DE LA SALUD



Sociedad
Mexicana de
Materiales



Capítulo Estudiantil
de la SMM-IPICYT



IPICYT
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

La Sociedad Mexicana de Materiales A.C.

Otorga el presente

Reconocimiento

a: Clara de la Luz Carreón Álvarez

Por su participación en el concurso de posters en
el marco del 4SPICM con el trabajo "Thermal
ablation of tumors by anisotropic AUNPS
functionalized with BSA".

QFB Armando González Sánchez
Presidente del CESMM-IPICYT

MC Sayma Adriana Rodríguez Montelongo
Vicepresidenta del CESMM-IPICYT

Ing Lorena Gárate Vélez
Secretaria del CESMM-IPICYT

MC Diana Moreno Castillo
Tesorera del CESMM-IPICYT

San Luis Potosí, S.L.P., a 13 de abril del 2018



August 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

This is to certify that Clara de la Luz Carreón Álvarez, *Felipe de Jesús Herrera Ponce*, *José Luis Sánchez-García*, *Rubén López-Revilla*, *José Luis Rodríguez-López* presented the contribution: **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH BOVINE SERUM ALBUMIN FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**, in the Biomedical Applications of Nanoparticles Symposium at the XXVI International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 20th to 25th, 2017.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President





August 2016

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

This is to certify that Clara de la Luz Carreón Álvarez, José Luis Sánchez García, Rubén López Revilla, José Luis Rodríguez López presented the contribution: **SYNTHESIS AND BSA FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES**, in the Biomaterials for Medical Applications Symposium at the XXV International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 14th to 19th, 2016.

Sincerely,



José Gerardo Cabañas Moreno
President

