

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudio de la conjugación de antifolatos a nanopartículas de oro

Alberto Bueno Costa

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat per Jeroni Morey Salvà

Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per	- Autor		Tutor	
a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament	Sí	No	Sí	No
acadèmiques i d'investigació	Х		Х	

Paraules clau del treball:

Nanopartículas, Oro, Antifolato, Raltitrexed, Terapia, Cáncer

Resumen

La nanotecnología es una disciplina muy prometedora en medicina, especialmente en el campo de la oncología. En la actualidad, los tratamientos contra el cáncer son altamente lesivos para el paciente, debido principalmente a la baja especificidad que presentan los fármacos antineoplásicos sobre las células diana y a las elevadas dosis necesarias. En el presente trabajo se trató de diseñar una posible alternativa a estos fármacos, mediante la aplicación de la nanotecnología.

Los objetivos de este estudio fueron sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con el antifolato Raltirexed y evaluar *in vitro* su capacidad anticancerígena.

Las nanopartículas se sintetizaron mediante una variación del método de Turkevich y se funcionalizaron en dos pasos, primero con L-Cisteína y posteriormente con Raltitrexed. La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo mediante diversas técnicas analíticas: ¹H-RMN, FT-IR, TEM, Espectroscopía UV/Visible, Potencial Zeta, Diámetro Hidrodinámico y Microanálisis Elemental CHNS. La evaluación *in vitro* del potencial antineoplásico de las nanopartículas se llevó a cabo sobre la línea celular HCT-116 (carcinoma colorrectal humano), comparándose los resultados con los efectos del fármaco libre.

Las nanopartículas resultantes presentaron un diámetro medio de 14,7 \pm 0,4 nm y el rendimiento de la funcionalización con Raltitrexed fue del 64%. Desgraciadamente, las nanopartículas funcionalizadas con el medicamento no presentaron efectos antineoplásicos evidentes.

Abstract

Nanotechnology is a very promising discipline in the field of medicine, especially in oncology. Nowadays, current cancer treatments are very harmful to the patients, mainly due to the low specificity that these drugs present against the target cells and the high doses required. In the present study we have tried to design a possible alternative to these drugs by applying nanotechnology.

The objectives of this study were to synthesize and characterize spherical gold nanoparticles functionalized with Raltitrexed and evaluate their anticarcinogenic potential *in vitro*.

The nanoparticles were synthesized by a variation of Turkevich's method and functionalized in two steps – first with L-Cysteine and subsequently with Raltitrexed. The characterization of the nanoparticles was performed using various analytical techniques: ¹H-MNR, FT-IR, TEM, UV/Visible spectroscopy, Zeta Potential, Hydrodinamic Diameter and CHNS Elemental Microanalisis. *In vitro* evaluation of the antineoplastic potential of the nanoparticles was carried out on the cell line HCT-116 (human colorectal carcinoma), comparing the results with the effects of the free drug.

The resulting nanoparticles had a mean diameter of 14.7 ± 0.4 nm and the yield of the functionalization with Raltitrexed was 64%. Unfortunately, these functionalized nanoparticles didn't show any antineoplastic effects.

ÍNDICE

1. Introducción - Cáncer y Nanotecnología	1
Nanotecnología y medicina	1
Fármacos antineoplásicos actuales basados en nanopartículas	3
Estrategias en el tratamiento del cáncer con nanopartículas	4
2. Raltitrexed y el metabolismo del ácido fólico	6
3. Nanopartículas de oro: propiedades, síntesis y funcionalización	8
Síntesis de AuNPs	9
Funcionalización de AuNPs	11
4. Objetivos experimentales	13
5. Materiales y métodos	13
Síntesis y funcionalización de AuNPs	13
Caracterización de las AuNPs	16
Viabilidad celular in vitro	17
7. Resultados	18
Síntesis y funcionalización de las AuNPs	18
Ensayo de viabilidad celular	23
8. Discusión y conclusiones	24
9. Bibliografía	27

1. Introducción - Cáncer y Nanotecnología

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales que se caracterizan por una división rápida e incontrolada de las células de un tejido, las cuales escapan de los mecanismos de control celular, pudiendo llegar a invadir otros tejidos distantes en el organismo. Se han descubierto más de 100 tipos distintos de cáncer, cuyos orígenes pueden estar determinados por componentes genéticos, ambientales o una combinación de ambos¹. Actualmente, el cáncer es una de las principales enfermedades causantes de morbilidad y mortalidad en el mundo, habiendo causado mundialmente la muerte de 8,2 millones de personas en 2012².

A pesar de que la investigación biomédica está logrando grandes avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (inmunoterapia, hormonoterapia, terapia dirigida...), los tratamientos predominantes a día de hoy son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia^{3,4}. Estos métodos, aunque efectivos en algunos tipos de cáncer, son extremadamente invasivos e inespecíficos, ya que pueden dañar a los tejidos sanos y causar graves efectos secundarios. Por esta razón, los dos mayores retos actuales en el tratamiento contra el cáncer son los siguientes:

- I. Incrementar la especificidad de acción del agente antineoplásico sobre la célula tumoral.
- II. Disminuir la dosis necesaria de fármaco para destruir el tumor.

De todas las disciplinas científicas que tratan de abordar estos desafíos, hay una que destaca por su rápida evolución y gran versatilidad: la nanotecnología.

<u>Nanotecnología y medicina</u>

Según la *Royal Society of London*, la nanotecnología es "la ciencia que se encarga del diseño, caracterización y aplicación de nuevas estructuras, dispositivos y sistemas, mediante el control de la forma y tamaño de la materia a escala nanométrica, entre 100 y 0,1 nm"⁵. La nanotecnología abarca una amplísima diversidad de aplicaciones en distintos campos como la cosmética, electrónica y la construcción entre otros.

En el ámbito de la medicina, los nanomateriales más utilizados son las nanopartículas (NPs), las cuales pueden ser clasificadas en inorgánicas y orgánicas⁶:

- Nanopartículas inorgánicas: Actualmente existe una gran variedad de NPs inorgánicas con gran potencial terapéutico y de diagnóstico, gracias a su fácil funcionalización y a su elevada relación superficie/volumen. Sus propiedades fisicoquímicas (e.g. propiedades ópticas y electromagnéticas) varían en función de su composición, tamaño y forma. En la figura 1 se ilustran algunas de las NPs inorgánicas más estudiadas en biomedicina.
- Nanopartículas orgánicas: La formación de dispersiones de NPs orgánicas resulta muy útil para transportar y liberar productos farmacéuticos insolubles en agua en los distintos tejidos. Este grupo de NPs está conformado principalmente por los liposomas y sistemas poliméricos (dendrímeros y micelas), aunque proteínas como la albúmina y la ferritina pueden ser utilizadas como nanopartículas orgánicas.



Figura 1. Nanopartículas (NPs) con gran potencial terapéutico y de diagnóstico. (Xing et al. 2014)⁶

Ambos tipos de nanopartículas presentan un gran número de posibles aplicaciones biomédicas; aplicaciones que se pueden agrupar en dos grandes grupos⁷:

1. Nanopartículas como herramientas de diagnóstico: Las nanopartículas inorgánicas como los Quantum Dots o las nanopartículas de oro son una prometedora alternativa a los típicos colorantes usados en la visualización *in vitro* e *in vivo* de tejidos, al presentar una gran fluorescencia, una elevada resistencia al Photobleaching, y la capacidad de marcar específicamente tipos celulares concretos en función del ligando conjugado a la superficie de la nanopartícula (e.g. anticuerpo específico contra un marcador de células tumorales; ver figura 1). Así mismo, el uso de nanopartículas de hierro supramagnéticas como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear permiten conseguir una mejor visualización de tumores metastáticos.



Figura 1. (A) Ilustración de un *Quantum Dot (QD)* usado en la visualización *in vivo* de tumores. **(B)** Imagen de fluorescencia de un ratón vivo que muestra la acumulación específica de QDs en tumores. (Murthy 2007)⁷

2. Nanopartículas como herramientas terapéuticas: Las nanopartículas pueden actuar como sistemas de transporte de fármacos y material genómico para su posterior liberación en las células diana. Actualmente, la mayoría de NPs utilizadas para este propósito son orgánicas, especialmente liposomas y micelas poliméricas, aunque existen diversos estudios y ensayos clínicos sobre el uso nanopartículas inorgánicas. Las ventajas derivadas del uso de NPs como transportadores farmacológicos son varias⁸:

- a. Mejoran la solubilidad de fármacos poco solubles en soluciones acuosas.
- b. Alargan la vida media de los fármacos en circulación, ralentizando su aclaramiento renal y su metabolización hepática.
- c. Permiten controlar la velocidad de liberación del fármaco a las células.
- d. Minimizan los efectos secundarios sistémicos al poder liberar fármacos específicamente sobre células diana.
- e. Se generan efectos sinergísticos y se suprime la resistencia a los fármacos al poder combinar dos o más fármacos en una misma nanopartícula.

A lo largo de los años se hace más evidente las ventajas del uso de nanopartículas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, oculares, microbiológicas y respiratorias entre otras muchas posibilidades⁷.

Sin embargo, el campo donde las nanopartículas están teniendo un mayor impacto es en el tratamiento del cáncer.

Fármacos antineoplásicos actuales basados en nanopartículas

A día de hoy existen 8 fármacos para tratar el cáncer aprobados comercialmente por la FDA y la EMA basados en el uso de nanopartículas:

Nombre comercial	Sistema	Componente Activo	Diana	Compañía Farmacéutica
Myocet	Liposoma	Doxorrubicina	Cáncer de mama	Elan Pharmaceuticals
Abraxane	Albúmina	Paclitaxel	Cáncer de mama metastático	Abraxis Bioscience
Doxil	Liposoma PEGilado	Doxorrubicina	Cáncer de ovario	Ortho Biotech
Eligard	Polímero Biodegradable	Acetato de Leuprolido	Cáncer de próstata	Sanofi Aventis
Caelyx	Liposoma PEGilado	Doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Schering Plough
DaunoXome	Liposoma PEGilado	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Diatos
Genexol-PM	Micela Polimérica	Paclitaxel	Cáncer de mama y pulmón	Samyang Biopharmaceuticals
Oncaspar	Micela polimérica	L-Asparaginasa	Leucemia linfoblástica	Sigma-Tau Pharma.

Podemos observar que las terapias listadas en la tabla 1 se basan únicamente en el uso de nanopartículas orgánicas (liposomas, albúmina y micelas poliméricas). Esta predominancia de las nanopartículas orgánicas es debida en gran parte a la baja toxicidad que presentan estas estructuras: los liposomas están formados por fosfolípidos naturales, la albúmina se presenta de forma natural en sangre y el Polietilenglicol (PEG) es un conocido polímero biocompatible y biodegradable.

Actualmente no existen en el mercado terapias contra el cáncer basadas en nanopartículas inorgánicas. A pesar de ello, numerosos estudios continúan evaluando la citotoxicidad que presentan estas nanopartículas en sistemas biológicos y parecen mostrar un futuro prometedor. De hecho, dos productos antineoplásicos basados en nanopartículas de oro, *Auroshell y Aurimmune,* están siendo evaluados en ensayos clínicos en fase 1 y 2, respectivamente⁹.

Estrategias en el tratamiento del cáncer con nanopartículas

A la hora de diseñar un fármaco antineoplásico basado en el uso de nanopartículas es necesario tener en cuenta una serie características propias de las células tumorales que nos permitan elaborar estrategias para su tratamiento.

Las células tumorales presentan una tasa de división muy alta, y es por ello que necesitan recibir una gran cantidad de nutrientes para mantener un metabolismo acelerado¹⁰ (oxígeno, glucosa, ácido fólico...). Para conseguir esto, dichas células liberan sustancias angiogénicas (VEGF, TGF o TNF entre otras muchas) para generar vasos sanguíneos *de novo* alrededor del tumor, aumentando así el flujo de nutrientes en las células cancerígenas¹¹. Así mismo, las células cancerígenas pueden sobreexpresar proteínas de membrana (transportadores y/o receptores) que les permitan captar una mayor cantidad de nutrientes (e.g. Transportador de Glucosa GLUT1, sobreexpresado en cáncer de mama)^{10,12}, además de sobreexpresar otros diversos marcadores de superficie¹³.

Haciendo uso de estas características, se pueden funcionalizar las nanopartículas para que actúen contra el tumor, mediante dos posibles *"Sistemas de Direccionamiento"* (*Targeting Systems*):

Passive Targeting: El Sistema de Direccionamiento Pasivo (Passive Targeting) aprovecha 3 diferencias fundamentales entre los tejidos sanos y las células cancerígenas: la vasculatura "con fugas" de los vasos sanguíneos que rodean el tumor¹⁴ (presencia de poros), la ausencia de drenaje linfático efectivo en el lecho tumoral¹⁵ y el microambiente acídico presente en el tumor¹⁶.

Debido a la rápida vascularización estimulada por las células tumorales (angiogénesis), estos vasos sanguíneos presentan una permeabilidad mucho mayor (poros de 100 – 780 nm de diámetro) en comparación a la mayoría de vasos normales (poros < 6 nm de diámetro)¹⁷, lo que facilita la entrada de nanopartículas funcionalizadas al tejido canceroso. Además, ya que no hay un drenaje linfático efectivo en el lecho tumoral, dichas nanopartículas quedarán acumuladas en las células cancerígenas. Este efecto combinado se le conoce como "Enhanced Permeability and Retention" (EPR)³.

Asimismo, ya que el pH del microambiente tumoral está por debajo del pH fisiológico debido a la elevada actividad glucolítica de las células tumorales, se pueden diseñar nanopartículas sensibles al pH que liberen los agentes terapéuticos al entrar en dicho ambiente acídico³.

Active Targeting: Por otra parte, el Sistema de Direccionamiento Activo (Active Targeting) se basa en la conjugación de la nanopartícula con un "Motivo de Direccionamiento" (Targeting Moiety) que reconozca un componente sobreexpresado por las células tumorales, permitiendo así una acumulación preferencial de las nanopartículas en éstas. Además del Motivo de Direccionamiento, dichas nanopartículas deberán cargar a la vez con el fármaco antineoplásico que realice su efecto una vez internalizado en la célula cancerígena¹⁴.

Los Motivos de Direccionamiento pueden ser anticuerpos que reconozcan antígenos que se sobreexpresen en las células tumorales (*Antibody Targeting*), lectinas que reconozcan carbohidratos sobreexpresados en éstas (*Carbohydrate Targeting*) u otros compuestos que sean reconocidos por receptores de superficie celular sobreexpresados en las células cancerígenas (*Receptor Targeting*)^{14,15}.



Figura 2. (Izquierda) Esquema de la *Enhanced Permeability and Retention (Passive Targeting)* que presentan los tumores. Las nanopartículas (NPs) pueden atravesar los grandes poros presentes en los vasos que irrigan a los tumores, penetrando en el lecho tumoral, cuya acidez estimulará la liberación del fármaco cargado por las NPs. (Derecha) Esquema del *Active Targeting*. La nanopartícula presenta en su superficie moléculas que son reconocidas preferentemente por los receptores sobreexpresados en las células tumorales. *(Cerqueira 2015)*³

Por lo tanto, las nanopartículas con fines antineoplásicos pueden diseñarse en base a uno o a ambos sistemas de direccionamiento.

En nuestro caso, hemos diseñado nanopartículas de oro de 15 nm de diámetro funcionalizadas con Raltitrexed. En una situación *in vivo*, estas nanopartículas podrían llevar a la vez un *Passive Targeting*, gracias a su tamaño, y un *Active Targeting*, gracias al Raltitrexed, que es reconocido por receptores de folato que se sobreexpresan en muchos tipos de células cancerígenas. Sin embargo, antes de entrar a detallar nuestro experimento, debemos explicar los efectos del Raltitrexed y por qué seleccionamos las nanopartículas de oro como medio de transporte.

2. Raltitrexed y el metabolismo del ácido fólico

El Raltitrexed (Tomudex o ZD1694) es un medicamento anticancerígeno de la familia de los antifolatos de quinazolina, usado como agente quimioterapéutico contra el cáncer colorrectal desde 1996^{18,19}. Tiene una estructura similar a la molécula N⁵,N¹⁰-Metilentetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF), un derivado del ácido fólico (Vitamina B9). Este antifolato es un potente inhibidor no-competitivo mixto de la enzima Timidilato Sintasa (TS), presentando una Ki de 62 nM²⁰. Dicha enzima se encarga de sintetizar dTMP a partir de dUMP y 5,10-CH₂-THF como cofactor, por lo que su inhibición bloquea la síntesis de ADN por falta de dTTP, impidiendo que las células con una alta tasa de replicación puedan proliferar.



Figura 3. Estructura química del Ácido Fólico (a), del Raltitrexed (b) y del 5,10-CH2-THF (c). Se detallan los subcomponentes químicos del ácido fólico en verde (a). (Gonen et al. 2012)²¹

Como podemos observar en la figura 3, el ácido fólico y sus derivados están compuestos por 3 subcomponentes químicos: un anillo de pteridina, un ácido p-aminobenzoico y un residuo de glutamato²¹. El ácido fólico puede entrar a la célula mediante 3 mecanismos distintos: *Transportador de folato reducido* (RFC), *Transportador de folato acoplado a protones* (PCFT) y *Receptores* α/β *de Folato* (FR_{α/β}). El ácido fólico *per se* es metabólicamente inactivo, por lo que debe metabolizarse en el citosol para dar Tetrahidrofolato (THF), el componente central del metabolismo del ácido fólico. Los folatos, incluido el ácido fólico, se poliglutamilan en el citosol por la enzima cFPGS. Esto les permite adquirir un mayor tiempo de retención en la célula y una mayor afinidad por sus enzimas.

En la figura 4 podemos observar que el metabolismo del ácido fólico cumple diversas funciones muy importantes para la célula:

- 1. Síntesis de TMP, AMP y GMP, necesarios para la síntesis de DNA.
- 2. Síntesis de S-Adenosil-Metionina (SAM), cosustrato que participa en la metiliación de DNA, proteínas y lípidos.
- 3. Síntesis de Metionina, Glicina y Formato.
- 4. Necesario para la eritropoyesis²² y el correcto desarrollo embrionario (no mostrado en la figura 4).



Figura 4. Metabolismo del Ácido Fólico y sus derivados. Ilustración inspirada en el artículo de Gonen et al. (2012)²¹.

Por otra parte, el Raltitrexed puede introducirse en las células a través dos vías de entrada: mediante el transportador de membrana RFC (principal vía de entrada de folatos a las células) o uniéndose específicamente al receptor de folato α (ver figura 4). Dicho receptor (FR α) es una glucoproteína periférica anclada a las caveolinas de la membrana plasmática de las células. Una vez unido al receptor, se introducirá a la célula por "Endocitosis mediada por receptor", siendo encapsulado en un endosoma que se fusionará con un lisosoma, donde el pH alcanza valores de 5. Finalmente, el Raltitrexed se libera al citosol, poliglutamilándose e inhibiendo a la Timidilato Sintasa (TS).

El transportador RFC, siendo la principal vía de entrada de folatos en las células, se expresa ubicuamente en el organismo, tanto en los tejidos sanos como en los cancerígenos²¹. Sin embargo, la expresión de receptores FR α en tejidos sanos se limita a tejidos epiteliales concretos (útero, placenta, retina, riñones y plexo coroide), mientras que en la mayoría de células cancerígenas se sobreexpresa dicho receptor, especialmente en cánceres de origen ovárico, cervical, pulmonar, renal, pancreático, colorectal, cerebral, de endometrio, de pecho y de vejiga¹⁶. Por ello, el receptor de folato α constituye un prometedor candidato para el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades cancerígenas.

No es la primera vez que se intenta utilizar el receptor de ácido fólico como estrategia para acceder a las células cancerígenas²³. Pero a día de hoy no tenemos conocimiento de estudios en los cuales se combinen nanopartículas de oro con Raltitrexed, un antifolato que combina el reconocimiento específico de los receptores FR α (*Active Targeting*) con potentes efectos antineoplásicos.

3. Nanopartículas de oro: propiedades, síntesis y funcionalización

Las nanopartículas de oro (AuNPs) no son en absoluto un descubrimiento reciente. El uso del oro coloidal se remonta al siglo V a.C. en China, Arabia y la India, donde se utilizaba con fines médicos. En la Europa medieval, el oro coloidal se usaba para dar colores rojos a vidrios decorativos. El alquimista Paracelso (1493 – 1541 d.C) utilizó oro coloidal para tratar desórdenes mentales y la sífilis, llegándose incluso a utilizar como tratamiento contra el alcoholismo a finales del siglo XIX²⁴. Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando los científicos comenzaron a explotar sus propiedades físico-químicas mediante la nanotecnología.

Las nanopartículas de oro presentan unas propiedades únicas que difieren de aquéllas que presenta el oro macroscópico (*bulk gold*):

• Plasmón de Resonancia: Las propiedades ópticas de las AuNPs son de gran interés, debido a la formación de Plasmones de Resonancia Localizados en Superficie (LSPR), oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción de los átomos de oro al ser excitados por un haz de luz de longitud de onda (λ) concreta. En el caso de las nanopartículas de oro esféricas menores de 50 nm de diámetro, la λ que genera el Plasmón es de aproximadamente 520 nm, aunque dicha longitud de onda varía según el tamaño, la forma, el tipo de funcionalización, el ambiente dieléctrico y el grado de agregación de las nanopartículas²⁴.

Esta propiedad es muy útil para la detección de sustancias a muy baja concentración, las cuales alteran el ambiente dieléctrico local de las nanopartículas (*chemical sensing*)²⁵, o para posibles terapias por ablación fototérmica contra el cáncer, ya que al excitar las AuNPs a dicha longitud de onda, liberan una gran cantidad de calor localizado en puntos concretos del organismo²⁶.

- Biocompatibilidad y baja citotoxicidad: Las nanopartículas de oro sin funcionalizar presentan una baja citotoxicidad y una buena compatibilidad biológica. Gracias a ello se pueden llevar a cabo métodos diagnósticos y terapias *in vivo* sin un elevado riesgo de que la partícula cause problemas al organismo²⁷.
- Tamaño y forma variable: Según el método empleado para sintetizar las AuNPs, se puede obtener una amplia variedad de nanopartículas con tamaños y formas diferentes. Las propiedades ópticas y funcionales varían en función de su tamaño y forma (e.g. la longitud de onda de excitación plasmónica, vide supra)²⁴. En la figura 5 podemos observar varias AuNPs con formas muy variadas.



Figura 5. Imágenes tomadas mediante TEM de nanopartículas de oro (AuNPs) con distintas formas: (a) Esferas; (b) Bastones o *"rods"*; (c) Bipirámides; (d) Bastones de oro cubiertos de plata; (e) *"Arroz"* (f) Shells de SiO2/Au; (g) Cuencos; (h) Shells de SiO2/Au (i) Tetreahedros, Octaedros y Cubotetrahedros; (j) Cubos: (k) Cajas de Oro/Plata; (l) Nanolunas. (Dykman & Khlebtsov 2012)²⁴

• Funcionalización sencilla: La funcionalización consiste en unir moléculas a la superficie de la nanopartícula para que ésta adquiera una función específica. Los átomos de oro presentes en la superficie de las AuNPs pueden *"fisio-adsorber"* otras moléculas mediante interacciones no covalentes o bien *"quimio-adsorberlas"* mediante enlaces covalentes (gracias a los orbitales híbridos 5d-6s formados por los átomos de oro superficiales), donde el enlace covalente "oro-azufre" es el más fuerte que se conoce en este tipo de nanopartículas²⁸. Las moléculas funcionalizadoras pueden otorgar a la AuNP diversas propiedades, como mayor estabilidad, biocompatibilidad o poder antineoplásico entre otras muchas funciones.

Todas estas propiedades hacen de las AuNPs unas prometedoras herramientas terapéuticas y de diagnóstico. Múltiples estudios están demostrando el papel diagnóstico de las AuNPs como biosensores (detección de patógenos en sangre, niveles de glucosa u otros metabolitos...) y como agentes para obtener bioimágenes (tomografía computerizada, RMN, fotoacústica, microscopía de fluorescencia...)^{24,29}. En cuanto a su potencial terapéutico, se están diseñando nuevos sistemas liberadores de medicamentos a partir de AuNPs para combatir el cáncer, el VIH y la diabetes entre otras enfermedades. Además, el LSPR generado por las AuNPs está permitiendo diseñar prometedoras terapias contra el cáncer mediante ablación fototérmica²⁴.

<u>Síntesis de AuNPs</u>

La síntesis de AuNP se basa, al igual que la síntesis de otros muchos tipos de nanopartículas inorgánicas, en la reducción de una molécula precursora que sea fuente de átomos de oro, los cuales interactuarán entre ellos. Estos átomos metálicos pasan por un proceso de nucleación y posterior crecimiento de la nanopartícula. Para evitar un crecimiento excesivo y la posible desestabilización o agregación irreversible de las nanopartículas, se añade a la reacción un agente estabilizante (surfactante), que ayuda a definir el tamaño final de la partícula³⁰. En la figura 6 se esquematizan los 4 pasos de los que consta la síntesis de nanopartículas inorgánicas en general:



Figura 6. Pasos en la síntesis general de nanopartículas inorgánicas.

Actualmente se han desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar AuNPs, cada uno permitiendo la obtención de nanopartículas con tamaños, formas y propiedades distintas. Estos métodos pueden ser agrupados en 3 grandes grupos^{29,31,32}:

 Métodos químicos: Son los más utilizados en la actualidad. El agente reductor es de origen químico (borohidruros, aminoboranos, hidracinas, hidroxilaminas, polioles, ácidos oxálico y cítrico, sulfitos, acetileno, azúcares o CO), al igual que el agente estabilizante (citrato de trisodio, taninos, tioles, ligandos fosfatados, oxigenados y nitrogenados, polímeros o albúmina, entre otros surfactantes).

- Métodos físicos: El paso de reducción es ejecutado por un agente físico (radiación gamma, microondas, ondas ultrasónicas, ablación láser, reducción electroquímica y reducción fotoquímica), aunque el paso de estabilización se lleva a cabo normalmente por un agente estabilizante químico.
- Métodos biológicos (Green chemistry): Con el objetivo de sintetizar nanopartículas sin el uso reactivos tóxicos y costosos que puedan dificultar su aplicación biomédica, se están desarrollando nuevos métodos para sintetizar AuNPs con tamaños y formas bien definidas mediante el uso de extractos de plantas (que contienen agentes reductores y estabilizadores naturales) y de microorganismos (levaduras o bacterias) con capacidad reductora natural.

En la tabla 2 hemos recopilado varios de los métodos químicos, físicos y biológicos más comunes para la síntesis de AuNPs:

 Tabla 2. Métodos para la síntesis química, física y biológica de AuNPs.

 PEG: Polietilenglicol; TTAB: Bromuro de Trimetilamonio; CTAC: Cloruro de Cetilmetilamonio; HAuCl₄: Ácido Tetracloroáurico

Tipo de método	Nombre del método	Agente precursor	Agente reductor	Agente estabilizante	Tamaño (nm) y forma	Ref.
	Turkevich/Frens	HAuCl₄	Citrato de trisodio	Citrato de trisodio	10 – 20 Esféricas	33,34
Químico	Brust/Schiffrin	HAuCl₄	$NaBH_4$	1-Dodecanotiol	1 – 3 Esféricas	35
Quinico	Martin	HAuCl₄	$NaBH_4$	1-Dodecanotiol	3.2 -5.4 Esféricas	36
	Navarro	HAuCl ₄	Acetilacetonato + Citrato de trisodio	Citrato de trisodio	13 – 90 Esféricas	37
	Irradiación-y	HAuCl₄	Rayos-y	Alginato de sodio	5 – 40 Esféricas	38
Eísico	Electroquímico	Ánodo de oro	Cátodo de platino	TTAB	8.3 – 58.3 Esféricas	39
FISICO	Fotoquímico	HAuCl₄	Radiación UV (254 nm)	CTAC	20 x 1000 Bastones	40
	Ablación láser ("Top-Down")	Placa de oro (99,99%)	Láser Yb:KGW	PEG/Dextrano	4 – 46 Esféricas	41
Dialásias	Vegetal	HAuCl₄	Avena sativa	Avena sativa	< 20 Esferas y triángulos	42
ыоюдісо	Microbiológico	HAuCl₄	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	7.3 – 7.6 Esféricas	43

Funcionalización de AuNPs

Para que la AuNP adquiera una función concreta es necesario conjugar una molécula de interés a su superficie (e.g. un fármaco o un producto fluorescente). En algunas ocasiones, el propio agente estabilizante puede actuar como la molécula funcionalizadora (e.g. antibióticos como la Ampicilina⁴⁴), pero la mayoría de veces es necesario realizar varios pasos adicionales^{31,32}:

- Conjugar directamente a la AuNP una molécula funcionalizadora por fisio-adsorción o mediante enlace covalente, desplazando de su superficie el agente estabilizante (fig 7 A).
- En caso de que no se pueda unir directamente la molécula funcionalizadora a la superficie de la AuNP, se debe unir a dicha superficie una molécula *linker* que presente un grupo funcional (e.g. grupo carboxilo, amino, anillos aromáticos...) que pueda posteriormente unirse química o físicamente con la molécula funcionalizadora. (fig 7 B).



Figura 7. Mecanismos de conjugación de las AuNPs, partiendo de una AuNP estabilizada por fuerzas electrostáticas con el agente estabilizante Citrato de trisodio. **(A) Mecanismo directo:** la molécula funcionalizadora puede unirse directamente a la nanopartícula, desplazando al agente estabilizante al formar enlaces covalentes energéticamente más estables. **(B) Mecanismo mediado por** *linker*: los átomos superficiales de la NP se unen primero a una molécula *linker* la cual se unirá a su vez a la molécula funcionalizadora. En este caso concreto, el grupo amino de la molécula funcionalizadora forma una amida con el grupo carboxilo del *linker* mediante el método NHS/DCC.

El abanico de moléculas funcionalizadoras que se pueden conjugar sobre la superficie de las AuNPs es prácticamente infinito. Sin embargo, los métodos químicos para llevar a cabo dicha conjugación suelen ser siempre los mismos. Dichos métodos se basan en la formación de un enlace covalente entre un átomo de oro de la superficie de la AuNP y un átomo de azufre presente en moléculas con un grupo tiol, un disulfuro cíclico o un ditiocarbamato (ver figura 8)³².

Dichos grupos funcionales azufrados pueden estar presentes en las moléculas funcionalizadoras o bien pueden formar parte de los *linkers* que posteriormente se unirán a las mismas. También es posible formar enlaces "oro-nitrógeno" mediante grupos amino, pero la fuerza de este enlace es muy débil (6 kcal/mol) en comparación con los enlaces covalentes "oro-azufre" formados con grupos tioles (47 kcal/mol)³².



Figura 8. (De izquierda a derecha) Tiol, disulfuro cíclico y ditiocarbamato enlazados covalentemente a átomos de oro de la superfície de una AuNP. (Vigderman 2013)³²

Sin embargo, en ocasiones se diseñan experimentos donde se busca una unión más débil entre la molécula funcionalizadora y la superficie de la AuNP (e.g. un sistema en el cual se libere un medicamento poco a poco en la circulación). En estos casos, la formación de enlaces "oro-nitrógeno" puede ser de interés⁴⁴, así como el uso de moléculas que se unan a la nanopartícula por fuerzas electrostáticas (fisio-adsorción)⁴⁵.

En la tabla 3 presentamos algunos de los métodos de conjugación de AuNPs actualmente en investigación, basados en su mayoría en la formación de enlaces "oro-azufre":

Material conjugado	Molécula Funcionalizadora	Linker	Tipo Conjugación	Función	Ref.
	ssDNA tiolado	_	Enlace covalente "oro-azufre"	Detección secuencias DNA	46
Oligonucleótidos	siRNA (con 40 cargas aniónicas)	PEG-SH (con 40 cargas catiónicas)	Enlace covalente "oro-azufre" + F. electrostáticas	Silenciamiento génico	47
	SH-RNA-Fluoresceína	_	Enlace covalente "oro-azufre"	Detección secuencias ssDNA	48
Anticuernos	Anti-EGFR monoclonal	-	Enlace covalente "oro-azufre"	Diagnóstico cáncer oral	49
Anticuerpos	Anti-Mucina-7	-	Enlace covalente "oro-azufre"	Terapia cáncer (Fototérmica)	50
Glúcidos	Derivado de la β-D-Lactosa	Ácido Lipoico	Enlace covalente "oro-azufre"	Detección de lectinas	51
Fármacos	Cis-Platino	L-Aspartato	F. Electrostáticas	Tratamiento cáncer hepático	45
Antineoplásicos	Tamoxifeno	PEG-SH	Enlace covalente "oro-azufre"	Tratamiento cáncer mama	52
	Ampicilina	_	Enlace débil "oro-nitrógeno"	Bactericida Gram +/-	44
Antibioticos	Vancomicina	Bis-Cisteamina	Enlace covalente "oro-azufre"	Bactericida Gram -	53
Polietilenglicol (PEG)	PEG-SH	_	Enlace covalente "oro-azufre"	Biocompatibilidad	54

 Tabla 3. Métodos de conjugación de moléculas funcionalizadoras a AuNPs.

Habiendo explicado las propiedades del Raltitrexed y los diferentes métodos de síntesis y funcionalización de AuNPs, pasaremos a detallar los objetivos experimentales del presente trabajo.

4. Objetivos experimentales

- I. Síntesis de AuNPs esféricas y funcionalización de su superficie con Raltitrexed.
- II. Caracterización de la nanopartícula funcionalizada.
 - a. Espectroscopía UV/Visible
 - b. Potencial Zeta y Diámetro Hidrodinámico
 - c. FT-IR
 - d. ¹H-RMN
 - e. TEM
 - f. Análisis Elemental
 - g. Calculo del rendimiento de la funcionalización, el número de ramificaciones, el porcentaje de superficie funcionalizada y el porcentaje de RTX de la muestra total.
- III. Evaluación *in* vitro del potencial antineoplásico de las nanopartículas funcionalizadas mediante el ensayo de viabilidad celular realizado sobre la línea cancerígena HCT-116.

5. Materiales y métodos

<u>Síntesis y funcionalización de AuNPs</u>

1. Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNPs)

Para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) tuvimos que optimizar *de novo* una variación del método establecido por John Turkevich (1951)³³, el cual permite obtener AuNPs esféricas de entre 10 - 20 nm de diámetro en disolución acuosa, evitando el uso de disolventes orgánicos (comunes en métodos mucho más modernos)^{35,37} que son incompatibles con sistemas biológicos. En la figura 9 se detalla el mecanismo molecular por el cual se realizó dicha síntesis, donde el Citrato de trisodio actúa a la vez como agente reductor y agente estabilizador.



Figura 9. Mecanismo de formación de AuNPs a partir de Ácido Tetracloroáurico y Citrato de trisodio. El Citrato de trisodio actúa a la vez como agente reductor y agente estabilizante.

Antes de iniciar la síntesis, todos los materiales de vidrio se lavaron con agua regia y se enjuagaron repetidas veces con agua ultrapura (Mili-Q), eliminando así rastros de oro u otros contaminantes que reaccionen accidentalmente con las nanopartículas.

Se disolvieron 20 mg de Ácido Tetracloroáurico $\cdot 3H_2O$ (5,08 × 10⁻⁵ moles, equivalentes a 10 mg de Au⁰) en 100 mL de agua ultrapura (Mili-Q). La disolución se depositó en un balón de destilación de 250 mL y se calentó a 100 °C con agitación constante. En un vial aparte se disolvieron 104,5 mg de Citrato de trisodio $\cdot 2H_2O$ (3,6 × 10⁻⁴ moles, ratio molar 7:1 Citrato:Au⁰) en 1 mL de agua ultrapura.

Cuando la disolución de Ácido Tetracloroáurico alcanzó el punto de ebullición, manteniendo agitación constante, se añadió la disolución de Citrato de Trisodio dosificada en 4 fracciones (de 250 μ L cada una), cada dosis separada por un periodo de 5 – 10 segundos. Este fraccionamiento evita una reducción y aglomeración masivas de átomos oro, que darían como resultado nanopartículas demasiado voluminosas.

La reacción completa tarda aproximadamente 8 minutos, transcurso en el cual la disolución cambia de color de forma secuencial, tal y como podemos observar en la figura 10.

Una vez haya adquirido un color rojo carmesí, dejamos enfriar la disolución a temperatura ambiente. Se guardó una alícuota de 3 mL para posteriores análisis.



Figura 10. Cambio secuencial de colores durante la síntesis de AuNPs.

2. Conjugación de L-Cisteína (linker) a las AuNPs (AuNP-Cys)

El mecanismo molecular que se siguió para conjugar las AuNPs con L-Cisteína está ilustrado en la figura 11. La L-Cisteína actúa como *linker* para la posterior funcionalización de la AuNP con Raltitrexed.



Figura 11. Conjugación de las AuNP con L-Cisteína. Las moléculas de L-Cisteína desplazan la capa de Citrato al formar fuertes enlaces covalentes con los *orbitales híbridos "5d-6s"* de los átomos de oro presentes en la superficie de las AuNPs.

Se preparó en un vial aparte una disolución compuesta por 6,15 mg de L-Cisteína (5,08 × 10^{-5} moles, ratio molar 1:1 Cisteína:Au⁰) disueltos en 1 mL de agua ultrapura. Una vez la disolución con las AuNPs haya alcanzado la temperatura ambiente, se adiciona la disolución con L-Cisteína dosificada en 4 fracciones (de 250 µL cada una), cada dosis separada por un periodo de 5 – 10 segundos. Se dejó agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. La disolución adquiere un color azulgris oscuro.

Al día siguiente, dicha disolución se repartió equitativamente en dos tubos Falcon de 50 mL y se realizaron 3 centrifugaciones a 200 g durante 5 minutos para concentrar y purificar las AuNP-Cys, cada vez resuspendiéndolas muy suavemente en agua ultrapura. Ambas fracciones concentradas se juntaron, se resuspendieron en 10 mL de agua ultrapura y se sometieron a diálisis durante 3 días (filtro *SnakeSkin® Dyalisis Tubing - MWCO 3,500 g/mol*). Finalmente, la disolución filtrada se sometió posteriormente a una liofilización a -35 °C durante 3 días más (Liofilizador *Virtis Advantage*).

A pesar de que la liofilización es un proceso de deshidratación suave, las AuNP son extremadamente lábiles y el estrés generado en dicho proceso provoca una pérdida considerable de muestra, obteniéndose únicamente un 30% de los 10 mg teóricos esperados. Por esta razón, nos vimos obligados a repetir todos los pasos descritos en los apartados 1 y 2 hasta cuatro veces, para poder obtener producto suficiente y así llevar a cabo las pruebas posteriores.

3. Funcionalización de las AuNP-Cys con Raltitrexed (AuNP-Cys-RTX)

El mecanismo molecular seguido para la funcionalización de las nanopartículas con Raltitrexed (RTX) se ilustra en la figura 12:



Figura 12. Mecanismo de reacción para la funcionalización de las AuNPs con Raltitrexed (RTX). El centro electrófilo del grupo carbodiimida del DCC es atacado por un grupo carboxilo del RTX, formando un éster. Dicho éster será atacado por el grupo alcohol del NHS, formando un buen grupo saliente y favoreciendo la formación de una amida entre el grupo carboxilo del RTX y el grupo amina de una de las cisteínas ancladas a la AuNP.

En un balón de destilación de 50 mL se introdujeron 5 mg de Raltitrexed $\cdot 1H_2O$ (1,0 × 10⁻⁵ moles) disueltos en 1 mL de DMSO y se añadieron 15,5 mg de DCC (7,5 × 10⁻⁵ moles) y 1,7 mg de NHS (1,5 × 10⁻⁵ moles) previamente disueltos en 2 mL de agua ultrapura. Se adicionaron posteriormente varias de las muestras liofilizadas de AuNP-Cys (4 muestras en nuestro caso; 15,2 mg en total), previamente disueltas en 5 mL de agua ultrapura. El pH de la mezcla se ajusta a 8,5 con unas gotas de NaOH y se agita a 37 $^{\circ}$ C durante 24 horas.

Al día siguiente, la mezcla anterior se sometió a diálisis durante 3 días (filtro *SnakeSkin® Dyalisis Tubing - MWCO 3,500 g/mol*) y se sometió a una liofilización a -35 °C durante otros 3 días más. En nuestro caso, el rendimiento de esta liofilización fue muy bajo, obteniéndose únicamente 5,55 mg de muestra deshidratada.

Caracterización de las AuNPs

1. Espectroscopía UV/Visible

Se analizó la radiación electromagnética absorbida por las muestras AuNP-Citrato, AuNP-Cys y AuNP-Cys-RTX (disueltas en agua ultrapura y sometidas a sonicación para romper al máximo los agregados reversibles, con una concentración de 0,5 mg/1,5 mL) en un rango de longitud de onda de 400 a 800 nm, con el objetivo de estudiar las fluctuaciones del Plasmón de Resonancia de dichas nanopartículas en función del tipo de molécula unida covalentemente a su superficie. Para ello se utilizó el espectrofotómetro *Shimadzu RF-5301PC*.

2. Potencial Zeta y Diámetro Hidrodinámico

El Potencial Zeta (ζ) indica la diferencia de potencial entre el disolvente donde están dispersas las nanopartículas y la capa de fluido que está adsorbido a la superficie de la nanopartícula. Cuanto mayor sea el valor absoluto del ζ , mayor estabilidad tendrá la nanopartícula en suspensión. Por otra parte, el Diámetro Hidrodinámico de las nanopartículas se calcula mediante la aplicación de la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), la cual nos permite calcular la distribución de tamaños de las nanopartículas en suspensión. Se estudió el ζ (método Fka Smoluchowski) y el Diámetro Hidrodinámico de las muestras AuNP-Citrato, AuNP-Cys y AuNP-Cys-RTX. Sendas pruebas fueron realizadas mediante el instrumental *Malvern ZetaSizer Nano ZS*.

3. FT-IR

La Espectroscopía de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica muy útil (aunque con menos valor informativo que un ¹H-RMN) que permite analizar la energía absorbida por una molécula excitada con fotones cuya energía entra en el espectro del infrarrojo (número de onda de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹). Dicha absorción generará una serie de vibraciones en los enlaces moleculares (estiramiento, tijereteo, aleteo, balanceo y torsión) que podrán ser registradas y ordenadas. Visualizando dicho espectro se podrá comprobar si ha habido una interacción entre la AuNP y el fármaco. En este trabajo se analizaron los espectros IR de la L-Cisteína, el RTX, las AuNP-Cys y las AuNP-Cys-RTX, mediante el método de empastillamiento con KBr, usando el espectroscopio de infrarrojos *Bruker Tensor 27*.

4. ¹H-RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de Protones (¹H-RMN) es una potente técnica que aprovecha las propiedades electromagnéticas de los protones para obtener información muy precisa sobre la estructura de una molécula. Los protones de la molécula en estudio se excitan mediante un fuerte campo electromagnético y se registra la energía desprendida por estos protones una vez vuelven a su estado energético relajado. En el presente estudio se analizaron los espectros de ¹H-RMN de la muestra AuNP-Cys-RTX liofilizada (disuelto en D2O:DMSO deuterado), del Raltitrexed libre (disuelto en DMSO deuterado) y una muestra AuNP-Cys-RTX más concentrada, producto de una nueva síntesis (disuelta en DMSO deuterado). Para ello se utilizó el aparato *Bruker Avance 300 MHz*.

5. TEM

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) es una técnica que nos permite obtener imágenes de alta resolución a escala nanométrica aplicando un haz de electrones sobre la muestra. Esta técnica se utilizó para calcular el diámetro real de las nanopartículas presentes en la muestra AuNP-Cys-RTX. Para ello si hizo uso del Microscopio Electrónico de Transmisión *HITACHI H-600 ABS*.

6. Análisis Elemental

Con la finalidad de conocer el número de moléculas de Raltitrexed unidas a las nanopartículas de oro, se enviaron 2,1 mg de AuNP-Cys-RTX liofilizadas a la Universidad Complutense de Madrid (Centro de Asistencia a la Investigación) para realizar un Microanálisis Elemental CHNS.

<u>Viabilidad celular in vitro</u>

La línea celular escogida para estudiar el potencial anticancerígeno de las AuNP-Cys-RTX fue la HCT-116 (carcinoma colorrectal humano, con niveles de receptor de folato α relativamente bajos)⁵⁵, cortesía de la Dra. Gwendolyn Barceló-Coblijn (IdISPa, Hospital de Son Espases). Las células se cultivaron en medio McCoy's 5A (medio rico en ácido fólico) con FBS al 10%.

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular, las células HCT116 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5500 células/pocillo en 200 μ L de medio McCoy 5A. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, las células fueron tratadas durante 24, 48, 72 y 96 horas con Raltitrexed libre (2000, 1000 y 250 nM), AuNP-Cys-RTX (cantidad equivalente a 2000, 1000 y 250 nM de Raltitrexed) y AuNP-Cys (cantidades equivalentes a las de AuNP-Cys-RTX). Por motivos de baja solubilidad, sendas muestras fueron resuspendidas en una mezcla H₂O:DMSO (10:1), donde el DMSO presentó una concentración final por pocillo de 0,12% (v/v).

La cantidad de Raltitrexed en la muestra de AuNP-Cys-RTX se estimó a partir del Microanálisis elemental CHNS de la misma (*vide infra*), calculando el porcentaje de Raltitrexed unido a dichas nanopartículas. Por otra parte, la cantidad de AuNP-Cys se calculó a partir del peso de las muestras de AuNP-Cys-RTX equivalentes a 2000, 1000 y 250 nM de Raltitrexed.

La viabilidad de estas células se cuantificó por luminiscencia mediante el producto *CellTiter-Glo®* (Promega)⁵⁶, basado en la reacción de oxigenación de la luciferina catalizada por la luciferasa en presencia de Mg²⁺, ATP y O₂. Cuanto mayor sea la viabilidad celular, mayor será la concentración de ATP y, por consiguiente, mayor luminiscencia generará la reacción. La luminiscencia se cuantificó en el luminómetro *Synergy H1* (BioTek[®]).

Finalmente, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Excel (Windows[®]) aplicando la prueba de distribución T de Student (con diferencias significativas si el P-Valor < 0,05).

7. Resultados

Síntesis y funcionalización de las AuNPs

1. Espectroscopía UV/Visible

Los resultados se muestran en la figura 13. La muestra AuNP-Citrato muestra un máximo de absorción bien definido a 523 nm, típico del Plasmón de resonancia que presentan las nanoesferas de oro. Sin embargo, las muestras AuNP-Cys y AuNP-Cys-RTX muestran un rango de absorción muy amplio, con máximos de absorción poco definidos a 634 nm y 572 nm respectivamente. Estas diferencias en el perfil de absorción indican que ha habido cambios en la superficie de la nanopartícula debido a la unión covalente de distintas moléculas sobre ésta.





Figura 13. (Izquierda) Espectros de absorbancia de las muestras AuNP-Citrato, AuNP-Cys y AuNP-Cys-RTX. (Derecha) Fotografía de las muestras disueltas en 1,5 mL de agua ultrapura.

2. Potencial Zeta (ζ) y Diámetro Hidrodinámico

El ζ y del Diámetro Hidrodinámico de las nanopartículas se muestran en la tabla 4. El AuNP-Citrato presenta un pequeño diámetro hidrodinámico y un gran potencial zeta (en valores absolutos), lo que indica una gran estabilidad y baja tendencia a la agregación irreversible de las nanopartículas (gracias a las cargas negativas de las moléculas de citrato fisio-adsorbidas en la superficie de la AuNP).

En cuanto a AuNP-Cys, el ζ es mucho menor (debido al zwitterión formado por el grupo carboxilo y amino de las cisteínas), indicando que dichas nanopartículas son inestables y tenderán a agregarse irreversiblemente con el tiempo. Por otra parte observamos que el diámetro hidrodinámico ha aumentado, lo que indica que las nanopartículas interactúan entre sí electrostáticamente, formando agregados.

Nanopartícula	Potencial Zeta (mV)	Diámetro Hidrodinámico (nm)
AuNP-Citrato	-42,5	19,9
AuNP-Cys	-27,3	137,8
AuNP-Cys-RTX	-46,2	135,9

Tabla 4. Potencial Zeta y Diámetro Hidrodinámico de las 3 muestras de nanopartículas

Finalmente, el ζ de las AuNP-Cys-RTX indica que son nanopartículas muy estables en disolución (gracias al grupo carboxilo extra del Raltitrexed y a la formación de un grupo amida sin carga) pero a pesar de ello, el diámetro hidrodinámico muestra que las nanopartículas forman agregados.

3. FT-IR

El espectro de absorbancia en el infrarrojo de AuNP-Cys-RTX (figura 14, izquierda) presenta una serie de cambios clave respecto al espectro de AuNP-Cys, indicando que la funcionalización con el medicamento ha tenido lugar:

- Banda nueva en 3330 cm⁻¹ en AuNP-Cys-RTX, que puede indicar la formación de un grupo amida.
- La banda ancha de AuNP-Cys (1591 cm⁻¹) ha desaparecido, dando lugar a dos bandas muy fuertes y diferenciadas en AuNP-Cys-RTX (1627 cm⁻¹ y 1580 cm⁻¹), indicando la aparición de grupos carboxilo extras sobre la nanopartícula.
- Aparición de dos nuevas bandas en AuNP-Cys-RTX (1312 cm⁻¹ y 1245 cm⁻¹), que se corresponden a un anillo aromático, presente únicamente en el RTX (figura 14, flecha negra).



Figura 14. Espectros de absorbancia en el infrarrojo de las nanopartículas AuNP-Cys-RTX y AuNP-Cys (Izquierda) y de Raltitrexed y Cisteína libres (Derecha). La flecha negra indica los picos correspondientes al grupo aromático del Raltitrexed unido a la AuNP.

4.¹H-RMN

El espectro ¹H-RMN de AuNP-Cys-RTX no muestra signos de contaminación ni restos de Raltitrexed libre, aunque no se puede detectar el Raltitrexed unido a la AuNP, debido a la poca cantidad de muestra disponible. Para comprobar si la funcionalización mediante este método es correcta, se sintetizó aparte unas nuevas AuNP-Cys-RTX y se analizó a mayor concentración su espectro ¹H-RMN, comparando su región aromática (miniatura naranja de la figura 15, de 8.4 a 7.2 ppm) con el espectro ¹H-RMN del Raltitrexed libre. Esta comparación nos permite observar que las bandas de dicha región aromática han variado, indicando que la unión entre el RTX y la AuNP ha tenido lugar.



Figura 15. (Izquierda) Espectro ¹H-RMN de la muestra AuNP-Cys-RTX liofilizada y posteriormente estudiada por microanálisis elemental. (Derecha) Espectro ¹H-RMN de Raltitrexed libre. Se muestra una miniatura de la región aromática del espectro ¹H-RMN de una nueva muestra de AuNP-Cys-RTX más concentrada, que se volvió a sintetizar días más tarde.

5. TEM y cálculo del diámetro real de las nanopartículas

Analizando diversas imágenes de las AuNP-Cys-RTX tomadas mediante TEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de 14,7 \pm 0,4 nm. Además, estas imágenes nos permiten explicar los resultados obtenidos a partir del Diámetro Hidrodinámico (*vide supra*), donde las AuNP-Cys-RTX tienen una tendencia a agregarse reversiblemente entre ellas al estar concentradas, a pesar de presentar un elevado potencial zeta (ver figura 15).



Figura 16. (Izquierda) Imagen de TEM de la muestra AuNP-Cys-RTX a 150.000 aumentos. (Derecha) Diagrama de Caja que muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas en cuartiles (Q1, Mediana y Q3). Los bigotes se extienden hasta los diámetros mínimo y máximo.

6. Análisis Elemental

El resultado del microanálisis elemental CHNS de la muestra AuNP-Cys-RTX se ilustra en la tabla 5:

Elemento	%Elemento	%El. P.Atom
С	4,97	0,414
Н	0,96	0,952
N	0,98	0,070
S	1,40	0,044

Tabla 5. Resultados del microanálisis elementalde la muestra AuNP-Cys-RTX liofilizada

Rendimiento de la funcionalización

Para calcular el rendimiento de la funcionalización de la nanopartícula, debemos tener en cuenta que la AuNP puede tener unidos covalentemente a su superficie moléculas de Cys y moléculas de Cys-RTX (moléculas de Cisteína unidas a moléculas de Raltitrexed por medio de un enlace amida).

Las moléculas de Cys tienen 1 átomo de S y 1 de N (ratio N/S = 1) mientras que las moléculas de Cys-RTX tienen 2 átomos de S y 5 de N (ratio N/S = 2,5).

De esta manera, dividiendo el cociente "%Elemento/Peso atómico" de N (0,070) por el de S (0,044), obtendremos que el ratio N/S de nuestra muestra AuNP-Cys-RTX es de 1,59. Por ende...

Rendimiento Funcionalización = $100 * \frac{1,59}{2,5} = 64\%$

... siendo este un rendimiento más bajo de lo que normalmente se espera de este tipo de reacciones (\sim 90%). Este resultado nos indica que por cada 100 moléculas de Cisteína unidas a una AuNP, 64 de estas moléculas se encuentran unidas a una molécula de Raltitrexed (Cys-RTX).

Número de ramificaciones Cys-RTX

Para calcular el número teórico de ramificaciones Cys-RTX unidas a las AuNPs debemos hacernos dos suposiciones:

- Que la muestra liofilizada no presenta rastros de NHS, DCC, Cys ni RTX libres (confirmado por ¹H-RMN y por el bajo %N de la muestra analizada).
- Que a pesar de haberlas liofilizado, las nanopartículas siguen presentando moléculas de H₂O embebidas en su superficie (confirmado por ¹H-RMN y por el alto %H de la muestra analizada).

Teniendo esto en cuenta, se calculó de forma teórica y secuencial el % del resto de elementos (se obvian las unidades por motivos de espacio):

$\% 0 \text{ "Cys-RTX+Cys"} = \frac{N^{\circ} \ de \ At. \ 0 \text{ "Cys-RTX+Cys"}}{N^{\circ} \ de \ At. \ S \text{ "Cys-RTX+Cys"}} * \frac{\% S}{Peso \ At. \ S} * Peso \ At. \ 0 = \frac{0.64 * 7 + 0.36 * 2}{0.64 * 2 + 0.36 * 1} * (0.044) * 15,999 = 2, 23\%$
$\% H "Cys-RTX+Cys" = \frac{N^{\circ} de At. H "Cys-RTX+Cys"}{N^{\circ} de At. S "Cys-RTX+Cys"} * \frac{\% S}{Peso At. S} * Peso At. O = \frac{0,64 * 26 + 0,36 * 6}{0,64 * 2 + 0,36 * 1} * (0,044) * 1,008 = 0,508\%$
$\% H H_2 O = \% H \text{ total} - \% H \text{ "Cys-RTX+Cys"} = 0.96 - 0.508 = 0.452\%$
$\% 0 \ \mathbf{H_20} = \left(\frac{N^{\circ} \ de \ At. \ O \ H_2 O}{N^{\circ} \ de \ At. \ H \ H_2 O} * \frac{\% H \ de \ H_2 O}{Peso \ At. \ H}\right) * Peso \ At. \ O = \left(\frac{1}{2} * \frac{0,452}{1,008}\right) * 15,999 = 3, 58\%$
$\%$ <i>O</i> Total = $\%$ <i>O</i> "Cys-RTX+Cys" + $\%$ <i>O</i> $H_2O = 2,23 + 3,58 = 5,81\%$
$\% Au = 100 - (\% C + \% N + \% S + \% O \ total + \% H \ total) = 85,9\%$

Sabiendo ahora el % de cada elemento, se procedió a calcular el nº teórico de ramificaciones Cys-RTX en las AuNPs, suponiendo que son esferas perfectas y que éstas presentan átomos de oro (supuestos también como esferas perfectas) empaquetados en la AuNP con una densidad del 64% (densidad resultante del empaquetamiento aleatorio de esferas perfectas de igual tamaño) :



% Superficie de la AuNP funcionalizada

Sabiendo que cada AuNP-Cys-RTX presenta teóricamente 3343 moléculas de Cys-RTX unidas covalentemente a su superficie, podemos saber cuál es el % de superficie de la AuNP funcionalizada con RTX aplicando la siguiente fórmula geométrica:

$$\% Sup. AuNP Func. = 100 * \left(\frac{n^{\circ} Ramif. \frac{Cys-RTX}{AuNP}}{n^{\circ} At \frac{Au}{AuNP}}\right) * \left(\frac{1}{1 - \frac{(r_{AuNP} - 2 * r_{\acute{a}tomo\ oro})^{3}}{(r_{AuNP})^{3}}}\right) = 30,5\% Sup. AuNP Funcionalizada$$

% Raltitrexed presente en la muestra

Finalmente, para calcular el porcentaje de RTX presente en la muestra de AuNP-Cys-RTX liofilizada, simplemente hay que aplicar la siguiente fórmula:

```
%RTX en la muestra AuNP-Cys-RTX = Rendim. Func *(\%C + \%N + \%S + \%O \text{ Cys}+RTX + \%H \text{ Cys}+RTX) = 6,46\%
```

Ensayo de viabilidad celular

En la figura 17 podemos observar que las nanopartículas unidas al medicamento (AuNP-Cys-RTX) no parecen presentar el efecto antineoplásico esperado, incluso tras 96 horas de tratamiento. Por otra parte, las nanopartículas sin funcionalizar (AuNP-Cys) no parecen presentar efectos citotóxicos evidentes; tampoco presentan diferencias significativas respecto a las AuNP-Cys-RTX. Finalmente, el medicamento libre (RTX) ha tenido un efecto antineoplásico significativo sobre las células.

Curiosamente, la potencia antineoplásica del medicamento libre parece ser independiente de la concentración de Raltitrexed (2000 nM RTX presenta los mismos efectos sobre la viabilidad que 250 nM RTX). Sorprendentemente, tras 72 y 96 horas, las células tratadas con 2000 nM de RTX libre presentan una ligera pero significativa mayor viabilidad que aquellas tratadas con 250 nM y 1000 nM de RTX libre (ver figura 18).



Figura 17. Viabilidad de las células HCT116 tratadas durante 24, 48, 72 y 96 horas con diferentes dosis de AuNP-Cys (verde) y AuNP-Cys-RTX (azul) equivalentes a 2000, 1000 y 250 nM de Raltitrexed libre (rojo). Cada tratamiento se realizó por octuplicado (n = 8) en dos experimentos independientes, normalizados con células control inoculadas con el vehículo H₂O:DMSO (10:1). El asterisco (*) y la almohadilla (#) indican diferencias significativas entre la viabilidad resultante del tratamiento con Raltitrexed libre y las concentraciones equivalentes de AuNP-Cys y AuNP-Cys-RTX, respectivamente (P-Valor \approx 0).



Figura 18. Viabilidad celular de las células HCT116 tras 72 y 96 horas de tratamiento con 2000, 1000 y 250 nM Raltitrexed libre. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto al tratamiento con 2000 nM de Raltitrexed (de cada respectiva hora) y la almohadilla indica diferencias significativas entre 2000 nM y 250 nM de Raltitrexed libre (P-Valor < 0,0001).

Todos los resultados tras 72 horas de tratamiento con Raltitrexed libre muestran diferencias significativas en comparación con sus respectivos tratamientos de concentración equivalente tras 96 horas (significancia no mostrada en la gráfica) (P-Valor < 0,0001).

8. Discusión y conclusiones

Síntesis de AuNPs

La síntesis de AuNPs mediante la variación del método de Turkevich ha sido un éxito. Las imágenes tomadas por TEM indican la obtención de nanopartículas esféricas de aproximadamente 15 nm de diámetro, tamaño adecuado para llevar a cabo terapias de direccionamiento activo y pasivo. Además, es un método sencillo, limpio y que no hace uso de disolventes tóxicos para las células. Sin embargo, hemos encontrado toda una serie de complicaciones a nivel técnico que dificultan el trabajo con las AuNPs derivadas de este método:

- Este método de síntesis genera muy poca cantidad de muestra (< 10 mg de AuNP), cantidad que se ve aún más disminuida tras el proceso de liofilización (~30% rendimiento), hecho que complica mucho el manejo de las muestras. Esto obliga a repetir dicho proceso 4 o más veces para conseguir una cantidad manejable, lo que supone un gran gasto de material y tiempo.
- Al contrario que otros tipos de nanopartículas inorgánicas, como las de hierro o plata, las AuNPs son extremadamente lábiles al ser sometidas a procesos de centrifugación a altas revoluciones (>8000 g), donde los átomos de oro tienden a agregarse irreversiblemente entre sí, hecho que destruye las nanopartículas y complica en gran medida el proceso de purificación.

Funcionalización de las AuNPs con Raltitrexed

Por otra parte, el proceso de funcionalización de las nanopartículas con el antifolato no ha sido del todo eficaz, obteniéndose únicamente un 64% de rendimiento, donde sólo el 6,46% del peso total de la nanopartícula era Raltitrexed. Este bajo rendimiento es consecuencia del método de funcionalización utilizado en este experimento (método NHS/DCC), donde el DCC presenta baja solubilidad en agua y la temperatura de la reacción es demasiado baja (37 °C). El bajo rendimiento de esta reacción ya se evidenció en el pasado, cuando nuestro laboratorio funcionalizó nanopartículas de hierro con varios antifolatos^{57,58}.

Como posible solución a esto, se debería haber utilizado el método alternativo NHS/EDC, optimizado también por nuestro laboratorio en el pasado⁵⁹, donde el EDC es perfectamente soluble en agua y la reacción se realiza a 150 °C por microondas. El problema de este nuevo método es la alta temperatura a la que se someten las nanopartículas. A lo largo de nuestro trabajo hemos podido observar una agregación irreversible de las AuNPs si son sometidas a altas temperaturas. Ya que nuestro laboratorio nunca ha trabajado antes con AuNPs y la cantidad de muestra era escasa, optamos por utilizar el primer método, resultando en un grado de funcionalización más bajo de lo esperado.

Ensayo de viabilidad celular

Las nanopartículas de oro sin funcionalizar con el medicamento (AuNP-Cys) no han presentado efectos citotóxicos. Esto coincide positivamente con la bibliografía²⁷, confirmando que las nanopartículas de oro sin funcionalizar no son tóxicas para las células.

Sin embargo, las nanopartículas de oro funcionalizadas con Raltitrexed (AuNP-Cys-RTX) no han presentado efectos antineoplásicos evidentes, a pesar de haber introducido unas cantidades equivalentes a las 3 concentraciones de Raltitrexed libre estudiadas. En teoría, el Raltitrexed (RTX) unido a la AuNP debería ser reconocido específicamente por los receptores de folato α (FR α) expresados en la membrana plasmática de las células tumorales, permitiendo la endocitosis de la nanopartícula y la posterior liberación del medicamento en la célula gracias a la rotura del enlace amida entre la Cisteína y el RTX (rotura mediada por el pH ácido y las proteasas de los lisosomas)⁵⁸.

Por lo tanto, esta falta de potencial antineoplásico puede ser atribuible a que el rendimiento real de la funcionalización de la nanopartícula haya sido más bajo que el rendimiento calculado a partir del análisis elemental (que ya es bajo de por sí). Sin embargo, ya que la caracterización de las nanopartículas indica que la funcionalización sí ha tenido lugar, debemos pensar en otros posibles factores que hayan impedido la actuación de estas nanopartículas:

Disminución en la expresión del FRα inducida por folato: La línea celular HCT-116 expresa de por sí una cantidad relativamente baja de receptores de folato α (FRα) en su membrana plasmática⁵⁵. Pero además, varios estudios confirman que si esta línea se cultiva en un medio rico en ácido fólico (como el RPMI-1640 "estándar" o el McCoy 5A), la expresión de FRα puede disminuir hasta un 100%⁶⁰. En nuestro caso, se cultivaron dichas células en medio McCoy 5A, hecho que explicaría la falta de potencial antineoplásico evidenciado en el ensayo de viabilidad. La baja cantidad de FRα y la alta concentración de ácido fólico (que además de inhibir la expresión de FRα, compite con la nanopartícula por unirse a dicho receptor) son dos importantes factores que han podido impedir la internalización de las AuNP-Cys-RTX en las células.

Esto también explicaría por qué el Raltitrexed libre sí tiene efectos antineoplásicos y no la nanopartícula. Además de la vía FR α , el medicamento libre puede entrar a la célula mediante el transportador RFC, el cual se expresa constitutivamente en la membrana celular de HCT-116⁶¹. Pero este transportador es demasiado pequeño como para permitir entrar a las nanopartículas.

Desde un principio teníamos planeado realizar este ensayo en la línea cancerígena A549 (con la cual nuestro laboratorio tiene mucha más experiencia) cultivadas en medio RPMI-1640 sin ácido fólico (nº cat. L0503-500). A pesar de expresar muy poco FRα en condiciones normales, la línea A549 puede expresar dicho receptor si se cultiva en medio libre de folatos⁶², llegando a captar nanopartículas inorgánicas funcionalizadas con antifolatos, como confirma la bibliografía^{57,58}.

Desgraciadamente, a causa de inesperados problemas técnicos de última hora, nos vimos obligados a usar la línea HCT-116, con la cual nunca habíamos trabajado antes, usando el medio McCoy 5A recomendado por el laboratorio de cultivos del IdISPa (Hospital de Son Espases).

- Formación de agregados no endocitables: Como hemos podido comprobar mediante el análisis del Radio Hidrodinámico de las AuNP-Cys-RTX, dichas nanopartículas tienden a formar agregados reversibles (por fuerzas electrostáticas) de más de 100 nm de diámetro, por lo que podrían formarse impedimentos estéricos entre el receptor y el Raltitrexed unido a las AuNPs, impidiendo su endocitosis.
- Problemas en la digestión lisosomal de las nanopartículas: En caso de que las AuNP-Cys-RTX se hayan internalizado en la célula, cabe la posibilidad de que, una vez en los lisosomas, las proteasas no puedan romper el enlace amida que mantiene el Raltitrexed unido a la nanopartícula, debido a impedimentos estéricos generados entre ésta y la enzima.

Posibles experimentos adicionales

Con el objetivo de comprender y resolver estos resultados negativos, planteamos a continuación varios posibles experimentos nuevos:

- 1. **Ensayo de viabilidad sin ácido fólico**: Repetir el ensayo de viabilidad con las células HCT-116, pero esta vez en un medio de cultivo libre de folatos.
- Ensayo de viabilidad con células que sobreexpresan FRα: Repetir el ensayo de viabilidad (utilizando medios con y sin ácido fólico) en líneas cancerígenas que sobreexpresen FRα (como HeLa o KB) y comparar los efectos antineoplásicos de las nanopartículas con líneas celulares que expresen dicho receptor a niveles bajos (como A549 o HCT-116).
- **3.** Knock-Out/Knock-Down del gen RFC: Llevar a cabo un silenciamiento del gen que codifica para el transportador RFC (mediante oligonucleótidos anti-sentido o mediante disrupción génica por recombinación sitio-específica) en las células HCT-116, forzando a que el Raltitrexed libre entre obligatoriamente por la vía FRα. Esto nos permitiría saber si las nanopartículas funcionalizadas y el medicamento libre tienen efecto antineoplásico exclusivamente a través de esta vía.
- **4. TEM de secciones celulares y microscopía de fluorescencia:** Tras cultivar las células HCT-116 tratadas con las nanopartículas funcionalizadas con el medicamento (en medios con y sin ácido fólico), se prepararían secciones celulares para analizarlas por TEM. Esto nos permitiría comprobar empíricamente si las nanopartículas se han internalizado o no correctamente y si se encuentran secuestradas en los lisosomas. Así mismo, ya que las AuNP esféricas menores de 20 nm son autofluorsescentes (423 nm) al ser excitadas a 308 nm⁶³, se podría estudiar también dicha internalización por microscopía confocal de fluorescencia.
- 5. Simulación de un entorno lisosomal: Mediante un extracto de proteasas lisosomales y un pH ácido que simule el ambiente intralisosomal, podríamos estudiar por HPLC la cantidad de Raltitrexed liberado de las AuNP-Cys-RTX, para comprobar si estas proteasas lisosomales y el pH ácido pueden o no romper el enlace amida entre la Cisteína y el RTX⁵⁸.

Efectos del Raltitrexed libre: Una paradoja inesperada

Como era de esperar, el Raltitrexed libre ha tenido efectos antineoplásicos sobre las HCT-116, pues puede internalizarse en la célula por ambas vías FRα y RFC. Pero paradójicamente, podemos observar que el medicamento a 2000 nM tiene significativamente menos efecto que a 250 nM. Ya que la IC50 de las HCT-116 para el Raltitrexed es de 9,4 nM, es de esperar que entre 100 nM y 1000 nM de Raltitrexed haya menos de un 5% de diferencia en la viabilidad celular⁶⁴. Sin embargo, no hemos encontrado en la bibliografía casos donde mayor concentración de medicamento de lugar a una mayor viabilidad celular. No tenemos explicación objetiva a lo ocurrido. Tal vez haya sido un error de pipeteo, aunque de no ser así, estaríamos ante un mecanismo novel de resistencia a altas concentraciones de Raltitrexed digno de estudio (aunque esto difiera completamente de los objetivos de este trabajo).

Conclusiones

Se confirma la obtención de nanopartículas esféricas de oro con 14,7 \pm 0,4 nm de diámetro, funcionalizadas con Raltitrexed con un rendimiento del 64% (con 3343 ramificaciones Cys-RTX por AuNP). Desgraciadamente, estas nanopartículas no han tenido efectos antineoplásicos sobre las células HCT-116. Es necesario realizar más experimentos para estudiar más a fondo estos resultados.

9. Bibliografía

- Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W. & Thompson, C. B. The Molecular Basis of Cancer, 4th Edition. ISBN: 978-1-4557-4066-6
- 2. World Health Organization. Cancer. Fact sheet N 297 (2015).
- Cerqueira, B. B. S., Lasham, A., Shelling, A. N. & Al-Kassas, R. Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft für Pharm. Verfahrenstechnik e.V* 97, 140–51 (2015).
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Viñals, F. & Capellá, G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr. Pharm. Des.* 16, 3–10 (2010).
- Dowling, A., Clift, R., Grobert, N. & Hutton, D. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *R. Soc.* (2004).
- Xing, Y., Zhao, J., Conti, P. S. & Chen, K. Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. *Theranostics* 4, 290–306 (2014).
- Murthy, S. K. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. Int. J. Nanomedicine 2, 129–41 (2007).
- Zhang, L., Gu, F. X., Langer, R. S. & Farokhzad, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761–9 (2008).
- Pillai, G. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. SOJ Pharm. Pharm. Sci. 1–13 (2014).
- Aparicio, L. A., Calvo, M. B., Figueroa, A., Pulido, E. G. & Campelo, R. G. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int. J. Endocrinol.* **2010**, (2010).
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2, 213–9 (2006).
- Brown, R. S. & Wahl, R. L. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 72, 2979–85 (1993).
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N. & Sailor, M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. J. Cell Biol. 188, 759–68 (2010).
- Zwicke, G. L., Mansoori, G. A. & Jeffery, C. J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev.* 3, (2012).
- Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. & Shin, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1909–17 (2006).
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 1310– 6 (2008).
- Wang, J., Lu, Z., Gao, Y., Wientjes, M. G. & Au, J. L.-S. Improving delivery and efficacy of nanomedicines in solid tumors: role of tumor priming. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 1605–20 (2011).
- Theti, D. S. & Jackman, A. L. The role of alpha-folate receptormediated transport in the antitumor activity of antifolate drugs. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1080–9 (2004).

- Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012–43 (2009).
- Jackman, A. L., Taylor, G. A., Judson, I. R. & Hughes, L. R. ICI D1694, a quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor that is a potent inhibitor of L1210 tumor cell growth in vitro and in vivo: a new agent for clinical study. *Cancer Res.* 51, 5579–86 (1991).
- Gonen, N. & Assaraf, Y. G. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 15, 183–210 (2012).
- Koury, M. J. & Ponka, P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 105–31 (2004).
- Sharon, M. Surface Orchestration of Gold Nanoparticles Using Cysteamine as Linker and Folate as Navigating Molecule for Synaphic Delivery of Doxorubicin. J. Nanomedicine Res. 1, (2014).
- Dykman, L. & Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2256 (2012).
- Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H.-P. & Yong, K.-T. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chem. Soc. Rev.* 43, 3426–52 (2014).
- Huang, X. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). Alexandria J. Med. 47, 1–9 (2011).
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. & Wyatt, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1, 325–7 (2005).
- Wang, L.-S. Covalent gold. Phys. Chem. Chem. Phys. 12, 8694–8705 (2010).
- Shiringirishi, M., Prajapati, S., Yadav, P. & Verma, A. Gold nanoparticles: Promising and potential nanomaterial. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4, 4068–4082 (2013).
- Alex, S. & Tiwari, A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. J. Nanosci. Nanotechnol. 15, 1869–1894 (2015).
- Herizchi, R., Abbasi, E., Milani, M. & Akbarzadeh, A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artif. cells,* nanomedicine, Biotechnol. 1–7 (2014).
- Vigderman, L. & Zubarev, E. R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 663–676 (2013).
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55 (1951).
- Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature* 241, 20–22 (1973).
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid?Liquid system. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 801 (1994).

- Martin, M. N., Basham, J. I., Chando, P. & Eah, S.-K. Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D selfassembly. *Langmuir* 26, 7410–7 (2010).
- Navarro, J. R. G., Lerouge, F., Cepraga, C., Baldeck, P. L. & Parola, S. Nanocarriers with ultrahigh chromophore loading for fluorescence bio-imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials* 34, 8344–51 (2013).
- Tue Anh, N., Van Phu, D., Ngoc Duy, N., Duy Du, B. & Quoc Hien, N. Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by γ-irradiation with controllable size using different Au3+ concentration and seed particles enlargement. *Radiat. Phys. Chem.* **79**, 405–408 (2010).
- Huang, C.-J., Chiu, P.-H., Linn, J.-J. & Yang, C.-F. Electrochemically Controlling the Size of Gold Nanoparticles. J. Electrochem. Soc. 153, D193 (2006).
- Dong, S.-A. & Zhou, S.-P. Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B* 140, 153–159 (2007).
- Correard, F., Al-Kattan, A., Gingras, M., Kabashin, A. V & Braguer, D. Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5415–30 (2014).
- 42. Armendariz, V., Parsons, J. G., Jose-Yacaman, M. & Gardea-Torresdey, J. L. The extraction of gold nanoparticles from oat and wheat biomasses using sodium citrate and cetyltrimethylammonium bromide, studied by x-ray absorption spectroscopy, high-resolution transmission electron microscopy, and UV-visible spectroscopy. *Nanotechnology* 20, 105607 (2009).
- Reddy, A. S., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Fan, C.-W. & Wang, J.-C. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria Bacillus subtilis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 6567–74 (2010).
- Saha, B., Bhattacharya, J., Dasgupta, A. K. & Karmakar, P. In Vitro Structural and Functional Evaluation of Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics. *Nanoscale Res. Lett.* 2, 614–622 (2007).
- Tomuleasa, C., Soritau, O., Orza, A., Berindan-Neagoe, I. & Irimie, A. Gold nanoparticles conjugated with cisplatin/doxorubicin/capecitabine lower the chemoresistance of hepatocellular carcinoma-derived cancer cells. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 21, 188–196 (2012).
- Storhoff, J. J., Lucas, A. D., Garimella, V., Bao, Y. P. & Müller, U. R. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat. Biotechnol.* 22, 883–7 (2004).
- Kim, H. J., Takemoto, H., Yi, Y., Miyata, K. & Kataoka, K. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. ACS Nano 8, 8979–91 (2014).
- Kim, J. H., Estabrook, R. A., Braun, G., Lee, B. R. & Reich, N. O. Specific and sensitive detection of nucleic acids and RNases using gold nanoparticle-RNA-fluorescent dye conjugates. *Chem. Commun.* (*Camb*). 4342–4 (2007).
- El-Sayed, I. H., Huang, X. & El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. Nano Lett. 5, 829–834 (2005).

- Chen, C. H., Wu, Y. J. & Chen, J. J. Gold nanotheranostics: Photothermal therapy and imaging of mucin 7 conjugated antibody nanoparticles for urothelial cancer. *Biomed Res. Int.* 2015, (2015).
- Sakurai, K., Hatai, Y. & Okada, A. Gold nanoparticle-based multivalent carbohydrate probes: selective photoaffinity labeling of carbohydrate-binding proteins. *Chem. Sci.* 7, 702–706 (2016).
- Dreaden, E. C., Mwakwari, S. C., Sodji, Q. H., Oyelere, A. K. & El-Sayed, M. A. Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjug. Chem.* **20**, 2247–53 (2009).
- Gu, H., Ho, P. L., Tong, E., Wang, L. & Xu, B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett.* 3, 1261–1263 (2003).
- Niidome, T., Yamagata, M., Kawano, T., Katayama, Y. & Niidome, Y. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. J. Control. Release 114, 343–7 (2006).
- 55. O'Shannessy, D. J., Davis, D. W., Anderes, K. & Somers, E. B. Isolation of Circulating Tumor Cells from Multiple Epithelial Cancers with ApoStream(*) for Detecting (or Monitoring) the Expression of Folate Receptor Alpha. *Biomark. Insights* **11**, 7–18 (2016).
- 56. Promega. CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. at <https://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/tec hnical bulletins/0/celltiter glo luminescent cell viability assay protocol.pdf>
- López, K. A., Piña, M. N., Alemany, R., Vögler, O., Barceló, F.Morey, J. Antifolate-modified iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy: inclusion vs. covalent union. *RSC Adv.* 4, 19196 (2014).
- Kenia López Brito. Tesis Doctoral Síntesis De Compuestos Híbridos Nanoestructurados Y Evaluación De Su Comportamiento Supramolecular Y Actividad Biológica. (Universitat de les Illes Balears, 2013).
- Gutiérrez, S. Trabajo final de máster Optimización vía microondas de la conjugación de nanopartículas con residuos orgánicos. (Universitat de les Illes Balears, 2013).
- Hayashi, I., Sohn, K.-J., Stempak, J. M., Croxford, R. & Kim, Y.-I. Folate deficiency induces cell-specific changes in the steady-state transcript levels of genes involved in folate metabolism and 1carbon transfer reactions in human colonic epithelial cells. *J. Nutr.* 137, 607–13 (2007).
- Morales, C., Ribas, M., Aiza, G. & Peinado, M. A. Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. *Oncogene* 24, 6842–7 (2005).
- Mornet, E., Carmoy, N., Le Gall, T., Benvegnu, T. & Montier, T. Folate-equipped nanolipoplexes mediated efficient gene transfer into human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1477–1501 (2013).
- Abdelhalim, M. A. K. & M. Mady, M. Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. J. Nanomed. Nanotechnol. 03, (2012).
- Lu, X., Errington, J., Curtin, N. J., Lunec, J. & Newell, D. R. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin. Cancer Res.* 7, 2114–2123 (2001).