

TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE MÁSTER EN BIOQUÍMICA
MENCIÓN: BIOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS Y ENZIMAS

Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas: síntesis, caracterización y efectos de su interacción con proteínas plasmáticas

Autora: Lic. Liliianne de la Caridad Beola Guibert

Tutores: Dr. C Gladys Amalía Ruíz Estrada

Centro de Estudios Avanzados de Cuba

Dr. C María del Carmen Luzardo Lorenzo

Facultad de Biología. Universidad de La Habana

Tutor Académico: Dr. C Mey Ling Reyor

Facultad de Biología. Universidad de La Habana

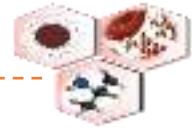


Universidad de la Habana
Facultad de Biología



Centro de Estudios
Avanzados de Cuba

La Habana, 2016



RESUMEN



ABREVIATURAS COMUNES (por orden alfabético)

acac	acetilacetato
CO	Grupo funcional carbonilo
COOH	Grupo funcional carboxilo
CP	Corona proteica <i>-del inglés- "protein corona"</i>
Dh	Tamaño/Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz <i>-del inglés- "Dynamic Light Scattering"</i>
DMSA	ácido dimercaptosuccínico <i>-del inglés- "dimercaptosuccinic acid"</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida <i>-del inglés- "ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide"</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético <i>-del inglés- "ethylenediaminetetraacetic acid"</i>
ESI	Ionización por electronebulización <i>-del inglés- "electrospray ionization"</i>
FDA	Agencia norteamericana para la regulación de fármacos y alimentos <i>-del inglés- "Food and Drug Agency"</i>
Fe	Hierro
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier <i>-del inglés- "Fourier Transform Infrared Spectroscopy"</i>
g	gravedades
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución <i>-del inglés- "High Performance Liquid Chromatography"</i>
LC	Cromatografía líquida <i>-del inglés- "Liquid Chromatography"</i>
MS	Espectrometría de masas <i>-del inglés- "Mass Spectrometry"</i>
MS/MS	Espectros de fragmentación
NaAc	acetato de sodio
NH ₂	Grupo funcional amino
NPM	Nanopartícula magnética
PDI	Índice de polidispersidad <i>-del inglés- "Polydispersity"</i>
PEG	Polietilenglicol



NSpC	Conteo espectral normalizado - <i>del inglés- "Normalize Spectral-Counting Method"</i>
OGP	N-octil-3-D-glucopiranosido
RES	Retículo endoplásmico
RP	Columna cromatográfica de fase reversa - <i>del inglés- "Reverse Phase"</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico - <i>del inglés- "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis"</i>
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SpC	Método de conteo espectral - <i>del inglés- "Spectral-Counting Method"</i>
SSTF	Solución salina tamponada con fosfato
T	Temperatura
TEM	Microscopio electrónico de transmisión - <i>del inglés- "Transmission Electron Microscopy"</i>
TGA	Análisis termogravimétrico - <i>del inglés- "Thermogravimetric analysis"</i>
VSM	Magnetómetro de muestra vibrante - <i>del inglés- "Vibrating Sample Magnetometer"</i>



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1-3
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Nanomedicina	4-6
1.2 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro	
1.2.1 Aplicaciones biomédicas.....	
1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas (NPMs)	
1.3.1 Descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro.....	
1.4 Funcionalización y estabilización en medio acuoso	
1.4.1 Modificación con polietilenglicol.....	
1.5 Toxicidad de las NPMs	
1.6 Formación de la proteína corona (CP)	
1.6.1 Implicaciones biológicas.....	
1.6.2 Procedimientos físico-químicos para el estudio de la CP.....	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Reactivos	
2.2 Preparación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro	
2.2.1 Síntesis.....	
2.2.2 Modificación superficial.....	
2.3 Caracterización físico-química de las nanopartículas magnéticas	
2.3.1 Tamaño y morfología.....	
2.3.2 Diámetro hidrodinámico y potencial ζ	
2.3.3 Composición química superficial.....	
2.3.4 Características magnéticas.....	
2.4 Ensayos <i>in vitro</i>	
2.4.1 Formación de la CP en torno a las nanopartículas magnéticas.....	
2.4.1 Separación de las proteínas plasmáticas adsorbidas a las NPMs.....	
2.5 Caracterización del complejo proteico CP	
2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	
2.5.2 Espectrometría de masas.....	
2.6 Procesamiento de los datos	



3. RESULTADOS.....

3.1 Síntesis y caracterización de NPMs de óxido de hierro con potenciales aplicaciones biomédicas.....

 3.1.1 Obtención de nanopartículas por el método de descomposición térmica.....

 3.1.2 Modificación superficial con DMSA y conjugación a diferentes derivados de PEG.....

3.2 Estudio de la evolución del complejo NPMs-CP.....

3.3 Composición y caracterización de la CP.....

 3.3.1 Caracterización de la CP por SDS-PAGE.....

 3.3.2 Determinación de la composición de la CP por LC-MS/MS.....

 3.3.3 Caracterización físico-química de la CP.....

 3.3.4 Análisis semicuantitativo de las proteínas séricas en la superficie de las NPMs.....

4. DISCUSIÓN.....

CONCLUSIONES.....

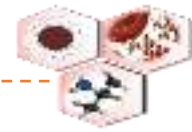
RECOMENDACIONES.....

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

ANEXOS.....

 ANEXO I: Perfil electroforético SDS-PAGE de la CP aislada a pH 4.

 ANEXO II: Proteínas individuales identificadas por espectrometría de masas agrupadas acorde a su estructura y/o función molecular.

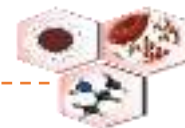


INTRODUCCIÓN

La capacidad de manipular la materia en la nanoescala, ha abierto un amplio campo de investigación en la búsqueda y desarrollo de materiales con nuevas propiedades. Es así como el creciente auge de la nanotecnología ha abarcado diversas ramas de la industria electrónica, cosmética, alimentaria, textil e incluso ha llegado a alcanzar un importante papel en la biomedicina, tanto en aplicaciones diagnósticas como terapéuticas.

Dentro de los nanomateriales utilizados en biomedicina, concretamente las nanopartículas magnéticas (NPMs) basadas en óxidos de hierro (magnetita Fe_3O_4 /maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) muestran un interés especial por su alta biocompatibilidad, características físico-químicas y propiedades magnéticas. Su tamaño nanométrico les permite interactuar a niveles celulares, subcelulares e incluso moleculares, dotándolas de gran utilidad para ser empleadas como agentes de contraste en imagen de resonancia magnética para el diagnóstico de diferentes patologías (Wang, 2011). En el ámbito de la terapia son aplicables en novedosos tratamientos como la hipertermia magnética (Wust *et al.*, 2002) y la liberación de fármacos de forma localizada (Arruebo *et al.*, 2007). Incluso aplicaciones actuales abogan por el desarrollo de nanoplataformas multifuncionales que permitan integrar en una misma partícula, agentes diagnósticos y terapéuticos, abriendo espacio a una nueva alternativa para la clínica: la teragnosis (Singh and Sahoo, 2013).

Uno de los retos más grandes en biomedicina es la obtención de nanopartículas altamente homogéneas y con propiedades magnéticas mejoradas. Numerosos trabajos han descrito rutas de síntesis eficaces para la producción de muestras monodispersas y de alta cristalinidad. Entre todos ellos, uno de las más empleadas, es la descomposición térmica, porque asegura un estricto control del tamaño y forma de las nanopartículas con respecto a otros métodos convencionales como la coprecipitación (Sun *et al.*, 2004). A su vez, metodologías como la PEGilación aportan la especificidad necesaria para que las NPMs puedan reconocer dianas biológicas concretas, a partir de su funcionalización con una amplia gama de moléculas bioactivas. Además, es una estrategia muy útil para aumentar el tiempo de residencia en sangre de los conjugados



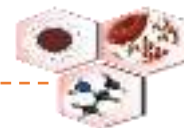
y evadir el reconocimiento del sistema inmune (Cole *et al.*, 2011; Masoudi *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013a)

A pesar de los avances en la investigación básica, e incluso clínica y preclínica de las nanopartículas para usos médicos, aún se conoce poco acerca de la interacción de estos nanomateriales con los sistemas biológicos. Este aspecto, independientemente de su extrema complejidad, es de vital importancia no sólo para alcanzar una óptima eficacia terapéutica, sino también por el impacto que estas NPMs pueden tener en la salud.

Recientemente se ha descrito cómo las nanopartículas resultan inmediatamente cubiertas por diferentes proteínas al entrar en contacto con el ambiente fisiológico (Lynch *et al.*, 2007). El estudio del proceso de formación y evolución de esta “corona de proteínas” (CP) exige un exhaustivo análisis, puesto que esta es la base para comprender la relación entre las propiedades físicas y químicas del nanomaterial y su conducta *in vivo*. Obtener esta información permitirá predecir su comportamiento biológico y así lograr una entrega selectiva en términos farmacológicos (Nel *et al.*, 2009).

En este proceso, el recubrimiento superficial de las NPMs es un factor imprescindible a considerar. Según la naturaleza química de las moléculas con las que se modifique la superficie; será la composición y disposición que adopten las moléculas adsorbidas y por ende la interacción del nanomaterial con el sistema biológico. Dichas interacciones pueden regular la biodistribución, el aclaramiento, la respuesta inmune y metabolismo de las NPMs. Estos procesos son los que pueden llevarlas a ser biocompatibles o tóxicas, además de modular su reconocimiento por el blanco terapéutico. Asimismo, se debe considerar que estas interacciones pueden llevar a cambios estructurales de biomoléculas, transformaciones de fase, liberación de energía, reestructuración y disolución en la superficie del nanomaterial (Mahmoudi *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que uno de los primeros requisitos para la aplicación biomédica de las nanopartículas es su hematocompatibilidad (Suh *et al.*, 2009), y que su primer



contacto con el organismo al ser administradas por vía intravenosa será con los diferentes componentes del plasma, en este estudio se decidió explorar los factores que influyen en esta interacción. Para ello se definió el siguiente **Objetivo general**:

Caracterizar químico-física y biológicamente la formación de la corona de proteínas plasmáticas en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con diferentes recubrimientos superficiales.

Para cumplimentar el objetivo propuesto se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Obtener nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con un estricto control del tamaño y forma de partícula.
2. Modificar superficialmente las nanopartículas con diferentes recubrimientos (DMSA, PEG 2000 Da y PEG 20 000 Da).
3. Caracterizar químico-físicamente las nanopartículas obtenidas.
4. Evaluar el impacto del recubrimiento superficial en la interacción de las nanopartículas con las proteínas del plasma.



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA (NO ARREGLADO)

2.1 Nanomedicina

El término nanotecnología procede del prefijo griego “nano” o del latín “nanus”, que significan “enano”. En la escala métrica hace referencia a las estructuras o compuestos en el rango de 10^{-9} . De manera general, la nanotecnología puede definirse como la actividad científico-tecnológica involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos con al menos una dimensión en la escala nanométrica (NNI, 2011). En la actualidad constituye una de las disciplinas de mayor relevancia del siglo XXI, pues su carácter multidisciplinar e interdisciplinar, permite englobar diversas áreas científicas como química, física, ciencia de los materiales, ingeniería, biología y medicina. Su aplicación al mundo científico y tecnológico ha permitido obtener materiales con nuevas propiedades, así como el desarrollo de numerosas herramientas con aplicaciones en disímiles campos de investigación.

Se considera nanomaterial a aquel sistema que al menos una de sus dimensiones oscila entre uno y cien nanómetros (Figura 1). El interés en estas dimensiones radica, en que para determinados materiales, algunas de las leyes físicas a escala nanométrica, difieren de las del material masivo, proporcionándoles propiedades únicas que garantizan sus múltiples aplicaciones.

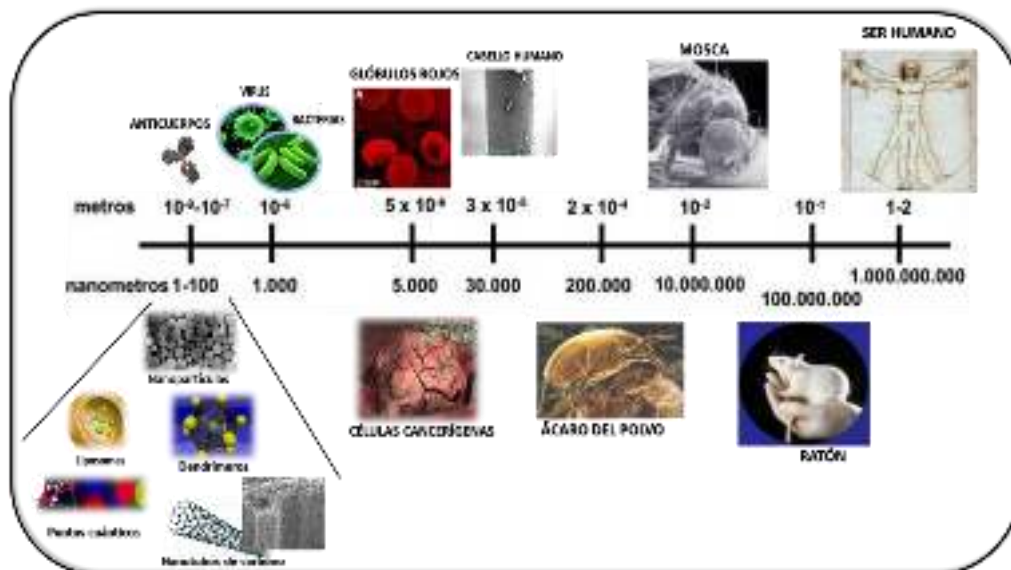
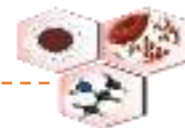


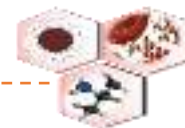
Figura 1. Tamaño relativo de biomoléculas, macromoléculas, sistemas nanoparticulados, células y organismos.



El estudio y aplicación de estos nanomateriales o dispositivos, en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades ha dado lugar al surgimiento de una nueva sub-rama en ascenso: la Nanomedicina; que se perfila como la de mayor proyección en un futuro próximo debido a su impacto en el cuidado de la salud y la tecnología médica.

Las aplicaciones de los nanomateriales en biomedicina son diversas. Sus principales ventajas consisten en: (i) Su escala de tamaño que posibilita su interacción con una amplia gama de entidades biológicas, tanto a escala micrométrica (células, microorganismos) hasta biomoléculas en un intervalo de tamaño nanométrico (receptores, anticuerpos y ácidos nucleicos). (ii) Sus características químico-físicas que permiten su derivatización con diversas moléculas bioactivas. (iii) La aparición de nuevas propiedades físicas a nivel de nanoescala como propiedades ópticas y magnéticas, permiten su utilización como herramientas de imagen para el diagnóstico de enfermedades (Liu et al., 2013). Por otra parte, sus propiedades magnéticas también permiten la direccionalización del nanosistema hacia sitios específicos dentro de ciertos tejidos e incluso permitir el movimiento de células enteras para la localización en un determinado sitio diana bajo la influencia de un campo magnético externo (Pankhurst et al., 2003; Pankhurst et al., 2009). (iv) La conformación estructural de algunos nanomateriales permite superar los problemas de solubilidad y estabilidad que presentan formulaciones tradicionales basadas solamente en biomoléculas (Barenholz, 2012). (v) Debido a su tamaño nanométrico, estos nanosistemas presentan una elevada relación área superficial/volumen y por tanto una gran capacidad de carga terapéutica en su superficie (isótopos radiactivos o fármacos). Estos agentes terapéuticos podrían ser dirigidos o concentrados en un tejido específico y generar un efecto mayor en el lugar de destino y por tanto reducir efectos adversos (Wang et al., 2013).

La variedad de materiales nanoparticulados que presentan interés en biomedicina es extensa. Una lista muy breve, con mayor o menor impacto en el área, incluye nanopartículas magnéticas y poliméricas, puntos cuánticos, liposomas y nanotubos de carbono. Dentro de este grupo, las nanopartículas magnéticas (NPMs) han cobrado un



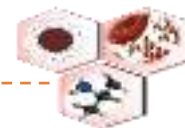
especial interés en las áreas de diagnóstico y en la terapia, precisamente por su capacidad de ser manipuladas bajo un campo magnético externo (Leslie-Pelecky and Rieke, 1996).

2.2 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

Referirse sólo al tamaño de las nanopartículas para caracterizarlas conduciría a una visión incompleta y parcial de las mismas, ya que presentan propiedades inusuales, muy diferentes a las que conocemos en el material masivo. Las nanopartículas de magnetita/maghemita presentan interesantes características en la nanoescala que han hecho posible algunos de sus principales aplicaciones en la investigación y la industria (Huber, 2005). En la actualidad estos sistemas son muy utilizados en el almacenamiento de datos, tintas de impresión, sellos magnéticos, sistemas de refrigeración magnética y altavoces. Su uso, en las últimas décadas, se ha hecho extensivo y es muy reconocido, en áreas como la biotecnología, biomedicina y estudios medioambientales (Lu et al., 2007).

El interés en las NPMs de óxido de hierro guarda estrecha relación con las propiedades físicas de su núcleo magnético, su alta relación área superficial/tamaño y la capacidad que poseen de unir moléculas de interés biológico en su superficie. (Laurent and Mahmoudi, 2011). En este sentido, el alto valor de magnetización que presentan constituye una de sus propiedades más atractivas para su amplio espectro de aplicaciones (Leslie-Pelecky and Rieke, 1996).

Para aplicaciones terapéuticas es necesario que el material presente un carácter superparamagnético, lo que implica la ausencia de magnetización remanente una vez que se retire el campo magnético aplicado (Colombo et al., 2012). Entre las partículas capaces de generar fluidos magnéticos estables (ferrofluido) con dichas propiedades se encuentran las derivadas de óxidos de hierro (Garcia et al., 2005) (Figura 2). El efecto superparamagnético se logra disminuyendo el tamaño de partícula hasta un valor crítico comprendido entre 1-100nm, en el cual, los dipolos en ausencia de campo externo, se orientan al azar y en consecuencia el momento magnético resultante es nulo (Lu et al., 2007) (Anexo I). De esta manera se asegura que las nanopartículas solo



se comporten magnéticamente en presencia de un campo externo, evitando la actividad remanente cuando no hay campo aplicado. Este hecho representa una ventaja excepcional al trabajar en sistemas biológicos (Ramón et al., 2009; Ruiz et al., 2014).

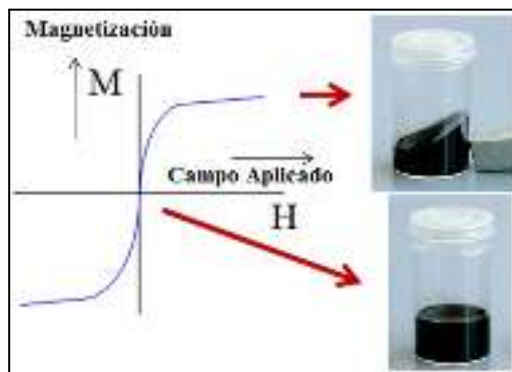
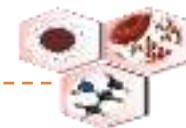


Figura 2. Comportamiento superparamagnético de las nanopartículas

2.3 Aplicaciones biomédicas

La utilización de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro dentro del campo de la biomedicina data de la década de los 90 del siglo XX (Tabla 1). El carácter superparamagnético de estos sistemas, así como la posibilidad de conjugar distintas biomoléculas en su superficie, abre un camino en la búsqueda de metodologías poco invasivas de asistencia al diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Pankhurst et al., 2003; Huber, 2005; Arruebo et al., 2007; Pankhurst et al., 2009). De los distintos aspectos de la nanotecnología el que seguramente sea más relevante para la nanomedicina es el del desarrollo de nanopartículas multifuncionales. Esta consiste en la presencia en la nanopartícula de sondas para distintas técnicas de imagen y fármacos para el tratamiento de una patología. Esta combinación es conocida en la actualidad como teragnosis (Shubayev et al., 2009; Rahman et al., 2012).

Las aplicaciones biomédicas de las NPMs pueden agruparse en dos grupos fundamentales: *in vitro* e *in vivo*. El principal uso en aplicaciones *in vitro* se basa en la selección y separación celular o molecular dirigido al desarrollo de aplicaciones diagnósticas (nanodiagnóstico) y la magnetorelaxometría (Lai et al., 2009; Laurent and Mahmoudi, 2011; Lee et al., 2011b).



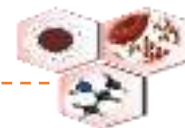
Los sistemas de nanodiagnóstico ofrecen una gran flexibilidad de diseño, ya que pueden aplicarse a muestras muy reducidas de fluidos corporales o de tejidos, permitiendo una detección específica en tiempos muy cortos, con gran precisión y sensibilidad (Chou et al., 2011).

Tabla 1. Formulaciones basadas en NPMs de óxido de hierro aprobadas por agencias regulatorias para su uso en humanos.

PRODUCTO	NANOSISTEMA	INDICACIÓN	STATUS	COMPAÑÍA
RESOVIST (Hamm et al., 1994)	Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de carboxidextrano	Agentes de contraste para hígado y bazo	Aprobado en Europa en 2001	Bayer Schering Pharma AG
FERIDEX (Weissleder et al., 1989)	Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano	Agentes de contraste para hígado y bazo	Aprobado por la FDA en E.E.U.U en 1996	Berlex Laboratories
ENDOREM (Weissleder et al., 1989)	Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano	Agentes de contraste para hígado y bazo	Aprobado en Europa	Guerbet

Por otro lado, la magnetorelaxometría es utilizada como un método de evaluación de inmunoensayos. La técnica se basa en la medición de los tiempos de relajación del momento magnético neto de un sistema de NPMs después de eliminar el campo magnético (Laurent and Mahmoudi, 2011). Otros ejemplos de aplicación *in vitro* de las nanopartículas en biomedicina, están relacionados con la inmovilización o recuperación de enzimas como biocatalizadores (Aguilar-Arteaga et al., 2010), así como el empleo de nanopartículas de óxido de hierro para marcaje celular como herramienta de diagnóstico (Cui et al., 2011).

Las aplicaciones *in vivo* de NPMs de óxido de hierro se encuentran divididas en dos áreas fundamentales: herramientas de diagnóstico (agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética nuclear) (Rosen et al., 2012) o aplicaciones terapéuticas como la hipertermia (Wust et al., 2002) y la liberación controlada de



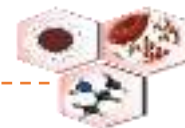
fármacos (Arruebo et al., 2007). La hipertermia intracelular, resulta particularmente interesante para el tratamiento localizado del cáncer. Esta técnica permite eliminar las células cancerosas sin dañar las células normales, lo cual es una de las principales metas en la terapia contra el cáncer desde hace muchos años (Maier-Hauff et al., 2011). El método consiste en reconocer las células cancerosas acumuladas en el interior de la zona afectada y calentar localmente hasta eliminar dichas células. El calentamiento se logra aplicando un campo magnético externo variable de baja intensidad, hasta que se alcance una temperatura suficiente (42-45°C) para destruir las células cancerosas (Villanueva et al., 2009; Arias et al., 2011; Piñol et al., 2015). Por otra parte, las NPMs como sistemas de liberación de fármacos presentan como ventajas: i) aumento de la estabilidad del fármaco y retardo en los procesos de degradación in vivo. ii) permite modificar la biodistribución del fármaco en el organismo al emplear un campo magnético externo (imanes) y dirigirlo a cierta zona del cuerpo. iii) liberar el fármaco mayoritariamente en la zona afectada y aumentar la eficacia del tratamiento con una reducción de los efectos adversos (Lechuga, 2011).

2.4 Métodos de síntesis de NPMs

Durante los últimos años se han descrito diferentes rutas para obtener de manera eficiente NPMs de dimensiones controlables, estables, y con una estrecha distribución de tamaños. Estos métodos pueden clasificarse en físicos y químicos.

Los métodos físicos tales como la molienda mecánica y condensación de gas inerte se basan en la subdivisión del material metálico masivo, metodología conocida como “top-down”. Aunque estos métodos son utilizados para preparar diversos tipos de NPMs, tienen la desventaja de ser poco efectivos para el control de tamaño, forma estructural y composición de las nanopartículas (Huber, 2005).

Los métodos químicos son posiblemente los más usados para el desarrollo de NPMs. En general estos métodos se basan en la precipitación de un núcleo constituido por unos pocos átomos metálicos y su posterior crecimiento. Entre los métodos químicos de síntesis más utilizados para aplicaciones biomédicas se encuentran la



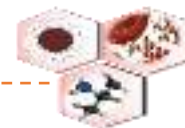
coprecipitación y la descomposición térmica en medio orgánico. (Massart, 1981; Sun et al., 2004; Lee et al., 2007; Roca et al., 2009).

El método de coprecipitación se realiza mediante la precipitación simultánea de dos soluciones de sales que contienen el metal específico. Luego en presencia de un líquido con un pH adecuado, las sales se descomponen liberando los iones metálicos. Estos iones tienden a unirse formando partículas, y si el crecimiento de dichas partículas se bloquea cuando son pequeñas (en el rango de los nanómetros) se obtienen las NPMs (Hernando et al., 2005). Con el fin de bloquear el crecimiento de la partícula estos métodos pueden incluir agentes de recubrimiento (surfactantes como el ácido oleico o polímeros como el dextrano), que se adhieren a los átomos metálicos o a la superficie del núcleo. Esto evita que se unan más átomos, controlando así el crecimiento de la nanopartícula.

El método de coprecipitación tiene entre sus principales ventajas la simplicidad y bajo coste del proceso, así como la cantidad de material que se obtiene. Sin embargo, la principal dificultad de esta metodología es el ajuste del tamaño medio de partícula y el control de la polidispersidad de la muestra (normalmente >30%), lo que va en detrimento de sus propiedades superparamagnéticas (Lu et al., 2007; Mahdavi et al., 2013). En cambio, la principal ventaja del método de descomposición térmica con respecto a la coprecipitación, es la obtención de nanopartículas con un alto grado de cristalinidad y homogeneidad, parámetro de gran importancia para aplicaciones en biomedicina (Sun et al., 2004; Salas et al., 2012).

2.4.1 Descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro

El método de síntesis basado en la descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro, es considerado uno de los mejores métodos para producir nanopartículas magnéticas altamente monodispersas, con un estricto control del tamaño y la forma (Park et al., 2005). La metodología en general tiene su fundamento en el mecanismo clásico de LaMer-Dinegar, donde se produce una corta etapa de nucleación a partir de una solución sobresaturada. A continuación tiene lugar una etapa de crecimiento lento de partículas sin nucleación adicional significativa. Con este método se consigue una

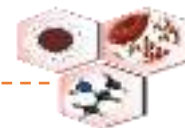


separación bien definida de las etapas de nucleación y crecimiento (LaMer and Dinegar, 1950) y por tanto un estricto control de la polidispersidad de la muestra (~10%) (Sun et al., 2006).

Este tipo de reacción está basada en procesos de descomposición de compuestos organometálicos de hierro como N-nitrosufenilhidroxilamina de hierro III ($\text{Fe}(\text{cup})_3$), acetilacetonato de hierro III ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) o pentacarbonilo de hierro ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), en disolventes orgánicos a altas temperaturas. Entre los surfactantes más utilizados se encuentran el dodecanodiol, oleilamina y el ácido oleico. Para el aumento de tamaño de las NPMs se pueden emplear disolventes de mayor punto de ebullición que permiten alcanzar hasta los 20 nm de tamaño de núcleo (Sun and Zeng, 2002; Sun et al., 2004). En cuanto a las desventajas del método suele citarse la presencia del ácido oleico recubriendo la superficie de las nanopartículas, ya que confiere un fuerte carácter hidrófobo a las mismas. En este caso es necesaria una segunda etapa de transferencia a medio acuoso. Sin embargo, aunque el uso del ácido oleico impone una segunda etapa en el proceso de obtención, está demostrado que juega un importante rol en la estabilización de las partículas durante la síntesis (Zhang et al., 2006).

2.4.2 Funcionalización y estabilización en medio acuoso

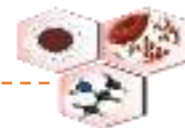
La estabilización en medio fisiológico de las nanopartículas, así como la capacidad de modificación y funcionalización de su superficie con moléculas, proteínas o polímeros, es un paso crucial para su uso en aplicaciones biomédicas y analíticas (Arruebo et al., 2007; Shubayev et al., 2009). Las NPMs obtenidas por cualquiera de los métodos descritos en el acápite anterior, necesitan para su aplicación *in vivo*, una segunda etapa de funcionalización que permita introducir moléculas bioactivas que les aporten la especificidad biológica buscada. Además, si como resultado de la síntesis presentan un exterior hidrófobo, se hace necesaria una etapa intermedia de transferencia a medio acuoso antes de la unión con una biomolécula. En este sentido, las principales rutas de funcionalización y estabilización de nanopartículas en agua desarrolladas hasta el momento pueden englobarse en tres grupos: la formación de micelas, modificación química del surfactante y el intercambio de ligando.



La formación de micelas consiste en la encapsulación de nanopartículas hidrofóbicas dentro de micelas formadas por moléculas anfifílicas. Su principal desventaja es la formación de micelas que pueden englobar en su interior más de una nanopartícula, lo que aumenta la heterogeneidad de la muestra (Wang et al., 2012). La modificación química del surfactante, por otro lado, está basada en la modificación directa de la estructura del surfactante. Una de las principales ventajas de la metodología, es que en ningún momento del proceso se deja expuesto el núcleo de la partícula, lo que minimiza su agregación (Herranz et al., 2008; Salinas et al., 2012). Finalmente, la reacción de intercambio de ligandos se basa esencialmente en la sustitución del ligando hidrófobo expuesto en la superficie de las partículas, por un ligando hidrofílico que presente afinidad hacia estas. Este tipo de reacciones se suele llevar a cabo empleando moléculas que presentan en su estructura grupos carboxílicos o fosfato con alta capacidad de coordinación al hierro de la nanopartícula y además algún otro grupo que proporcione estabilidad coloidal. En el caso de las nanopartículas de óxido de hierro existe una gran variedad de moléculas empleadas, entre las que destacan el ácido dimercaptosuccínico (DMSA, siglas en inglés) (Jun et al., 2005; Mejias et al., 2011; Ruiz et al., 2014) fosfonatos (Robinson et al., 2005), ácido cítrico (Taboada et al., 2007) y ácido 11-mercaptoundecanoico (Bagaria et al., 2006).

Según la finalidad terapéutica de la administración de las NPMs, otro parámetro importante es que el tiempo de circulación en sangre sea el suficiente para alcanzar los objetivos deseados (Arruebo et al., 2007). Uno de los mecanismos que permite prolongar su vida media en el organismo, así como aumentar su estabilidad coloidal, es el recubrimiento con polímeros biocompatibles. Entre los polímeros utilizados de forma habitual para el recubrimiento puede citarse el polivinilalcohol (PVA) y el quitosano que proporcionan una envoltura biocompatible, catiónica e hidrofílica (Gupta et al., 2007; Lee et al., 2011a). Otros polímeros también muy empleados como recubrimientos, por su alta biocompatibilidad y afinidad por el hierro son el dextrano y el polietilenglicol (PEG) (Weissleder et al., 1990; Gupta and Wells, 2004; Sun et al., 2010; Yu et al., 2012).

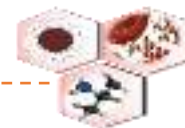
2.4.3 Modificación con PEG



El PEG, en su forma más común es un poliéter polimérico con grupos hidroxilo en sus extremos ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$). Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero u oligómero. Este polímero ha sido altamente investigado para la modificación covalente de macromoléculas biológicas y superficies con aplicaciones en la industria farmacéutica y en biotecnología debido a sus bajos perfiles de toxicidad e inmunogenicidad.

Evidencias de toxicidad inducida por PEG, solo se han observado en estudios donde se administra una cantidad 600 veces mayor que la dosis terapéutica; a consecuencia de la degradación de oligómeros de bajo peso molecular ($<400\text{Da}$) por la enzima alcohol deshidrogenasa. Sin embargo la inocuidad de los PEG de más de 1000 Da ha sido más que demostrada, en sus años de uso en alimentos, cosméticos y medicamentos, así como en formulaciones inyectables, tópicas, rectales, intranasales y oculares (Webster et al., 2009). A nivel inmunológico, el PEG se comporta como un inmunógeno débil. Hasta el momento no existen reportes clínicos de pacientes que generen anticuerpos contra esta molécula en el tratamiento con formulaciones PEGiladas. Sólo se han generado anticuerpos contra PEG mediante la conjugación a una proteína muy inmunogénica y utilizando Adyuvante de Freud. Además, no se han observado patrones de toxicidad o efectos adversos asociados a la presencia del PEG en las formulaciones farmacéuticas aprobadas (Webster et al., 2009).

La habilidad del PEG de ser soluble tanto en agua como en solventes orgánicos permite que pueda ser conjugado fácilmente y que la derivatización de nanopartículas o biomoléculas pueda hacerse en condiciones suaves que no afecten la estabilidad de las mismas (Ruiz et al., 2013b). El recubrimiento de las NPMs con PEG ofrece múltiples ventajas. (i) Debido a su alta flexibilidad y a la unión de las moléculas de agua, el PEG actúa como si fuera 5-10 veces más grande que una proteína soluble de masa molecular comparable. De manera que la conjugación de las nanopartículas al polímero, aumenta su tamaño aparente, reduciendo así la filtración renal y modificando su farmacocinética (Figura 3). (ii) La modificación superficial con PEG también disminuye la captación celular y el reconocimiento inmunogénico y



antigénico, previniendo la captación de las NPMs por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y el reconocimiento por receptores del sistema reticuloendotelial (RES). (iii) Además disminuye el reconocimiento y la degradación por enzimas proteolíticas. (iv) Otro aspecto importante del recubrimiento con PEG es la incorporación de diversos grupos funcionales del polímero a la superficie de las nanopartículas, que contribuyen a su posterior funcionalización con fármacos y moléculas bioactivas (Roberts et al., 2002; Wattendorf and Merkle, 2008).

Los métodos de conjugación a PEG de las nanopartículas magnéticas se basan fundamentalmente en: (i) la unión no covalente del polímero a la superficie de la nanopartícula, (ii) unión covalente, o (iii) los procesos que conducen a la formación de grandes agregados poliméricos con una proporción limitada de núcleos magnéticos en su interior, y por tanto una señal magnética pobre (Amici et al., 2011).

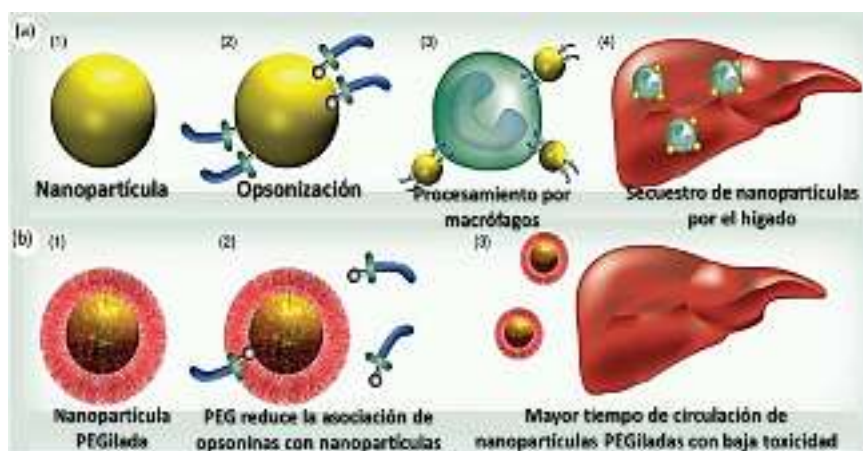
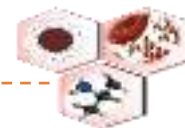


Figura 3. Efectos de la modificación superficial con PEG en el tiempo de circulación de NPMs. (a1) La superficie “desnuda” de las NPMs favorece la (a2) adsorción de proteínas opsoninas lo que facilita su (a3) reconocimiento y procesamiento por macrófagos y su (a4) acumulación en hígado. (b1) El recubrimiento con PEG (b2) reduce el reconocimiento por opsoninas, (b3) incrementando el tiempo de circulación en sangre. Adaptado de (Jesse V Jøkerst et al., 2011)

En este sentido, también se han desarrollado métodos de recubrimiento con PEG de partículas obtenidas por descomposición térmica en medio orgánico. Estos procedimientos se basan en reacciones de intercambio de ligando empleando reactivos de PEG derivatizados con grupos funcionales con alta afinidad por la superficie de óxido de hierro (Kohler et al., 2004; Xie et al., 2007; Amstad et al., 2009). Otra estrategia es la funcionalización previa de la superficie de las nanopartículas con moléculas pequeñas que contienen grupos carboxilo para su posterior conjugación covalente mediante



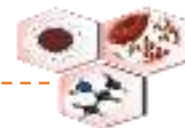
carbodiimida a un PEG aminado en su terminal de cadena (Fang et al., 2009; Ruiz et al., 2013b).

2.5 Toxicidad de las NPMs

El campo de las nanopartículas magnéticas aplicadas a la biomedicina muestra una enorme cartera de productos en fase de investigación o en diferentes etapas de ensayos clínicos. Esta diversidad, unido a que la nanotecnología (como ciencia relativamente joven) no explota aún todas sus potencialidades en el campo de la toxicología, hace difícil responder de forma categórica si las NPMs resultan tóxicas o no. En este punto, debe tenerse en cuenta que las mismas propiedades físico-químicas únicas que hacen atractivas a las NPMs para estas aplicaciones, también podrían causar daño cuando interactúan con los sistemas biológicos y el medio ambiente. Por lo tanto, los riesgos de exposición, mecanismos de toxicidad y vías de entrada al organismo de estos sistemas deben ser bien entendidos.

Aun cuando en la actualidad no existe un protocolo estandarizado para evaluar la toxicidad de productos nanotecnológicos para aplicaciones biomédicas, se han realizado avances en el estudio de los mecanismos que median este fenómeno tanto *in vitro* como *in vivo*. A diferencia de la toxicología clásica, cuya relación dosis-efecto se basa en el cociente masa/concentración, en nanotoxicología otros factores también están involucrados: tamaño, forma y modificación superficial de las nanopartículas (Oberdörster et al., 2005; Reddy et al., 2012).

De forma general las nanopartículas de óxidos de hierro son consideradas poco tóxicas comparadas con otras nanoestructuras que utilizan metales como oro (Au), plata (Ag), cobalto (Co) y níquel (Ni) (Berry, 2005). La alta biocompatibilidad de las NPMs de óxido de hierro, está dada en gran medida por la presencia de hierro en su estructura. El hierro es generalmente el metal de transición más abundante en el organismo de los mamíferos. En su mayoría se encuentra presente como un compuesto metalo-orgánico (hemoproteínas) o en el núcleo de proteínas como la ferritina (Gutierrez et al., 2006). Su función en los procesos metabólicos, está



relacionada con su capacidad de aceptar o donar electrones a través de su interconversión entre las formas férricas (Fe^{3+}) y ferrosas (Fe^{2+}).

Sin embargo, a pesar de su rol como metal esencial, altos niveles de iones hierro libres pueden causar desequilibrios en la homeostasis orgánica. Estudios *in vitro* han demostrado que nanopartículas de óxido de hierro de muy pequeño tamaño pueden causar efectos tóxicos, ya que pueden alcanzar concentraciones locales altas dentro de las células, lo que hace más difícil su eliminación por el organismo (Soenen et al., 2011). En general, los mecanismos de toxicidad celular de NPMs de óxido de hierro se han agrupado fundamentalmente en: (i) estrés oxidativo, resultado de la producción de ROS especies reactivas del oxígeno (ROS siglas en inglés) como consecuencia de su degradación lisosomal (Figura 4) (Donaldson et al., 2005; Singh et al., 2010), (ii) daños al citoesqueleto (Gupta and Wells, 2004) y (iii) genotoxicidad (Chen et al., 2010b).

En este sentido cabe destacar que los estudios de toxicidad aún son ambiguos. Por ejemplo, varios trabajos muestran que las NPMs de óxido de hierro no tienen ningún efecto genotóxico (Auffan et al., 2006), ni afectan la proliferación de células madres (Arbab et al., 2005), ni los patrones de expresión génica. En contraste, otros estudios que evidencian resultados contrarios (Chen et al., 2010a).

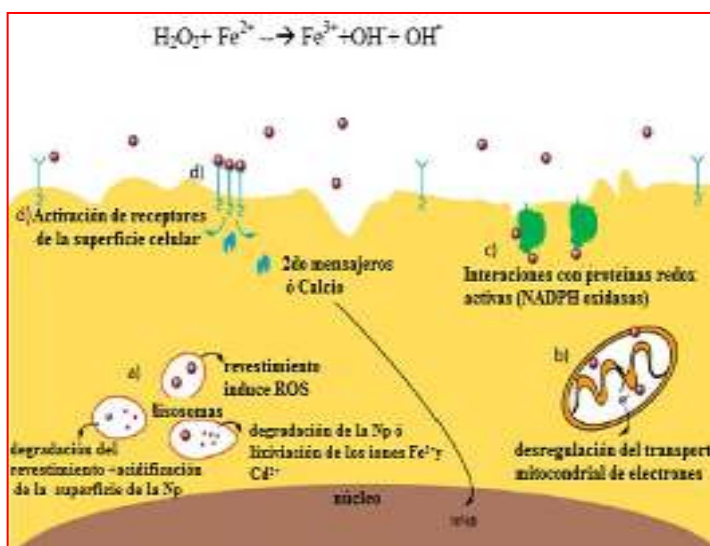
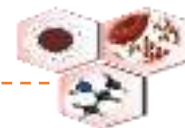


Figura 4. Ilustración esquemática de los diferentes mecanismos de ROS inducidos por los nanomateriales (a) la existencia del nanomaterial bajo condiciones ácidas (ej. lisosomas) induce ROS, como resultado de la reactividad del recubrimiento superficial y la exposición de superficies metálicas o de iones con carga doble positiva (Fe^{2+} , Cd^{2+}) al ambiente ácido, (b) la interacción del nanomaterial con la mitocondria genera disfunción mitocondrial, (c) la interacción del nanomaterial con proteínas redox activas como la NADPH oxidasa, estimula la producción de altos niveles de ROS por células del sistema inmune (d) la interacción del nanomaterial con receptores de superficie, activa las rutas de señalización intracelular, induciendo la expresión genes responsables de estrés que regulan positivamente la acumulación de ROS. Adaptado de (Soenen et al., 2011)

Estas aparentes diferencias entre los estudios realizados puede estar relacionada con la elevada variabilidad experimental en la selección de las condiciones de trabajo:

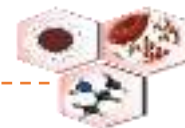


tipos de células ensayadas, variabilidad en la forma de preparar las nanopartículas y las concentraciones utilizadas, y por último diferencias en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas empleadas (Laurent et al., 2012).

Por otro lado, los análisis toxicológicos en modelos *in vivo*, que incluyen ensayos de farmacocinética, biodistribución, absorción, metabolismo y excreción, así como ensayos de toxicidad aguda, no evidencian niveles de toxicidad elevados asociados con el uso de NPMs de óxido de hierro (Konczol et al., 2011; Babadi et al., 2012; Fatahian et al., 2012; Liu et al., 2013).

Las investigaciones en modelos animales acerca de la biodistribución de las nanopartículas de óxido de hierro son diversas. Los estudios evidencian que en este fenómeno influyen no sólo el tamaño y las propiedades superficiales de las mismas, sino también las vías de administración en el organismo. De manera general, la biodistribución final típica de las NPMs (10-100nm) tras la administración intravenosa es del 80-90% en el hígado, 5-8% en bazo y pulmones y de un 1-2% en médula ósea (Duguet et al., 2006; Ruiz et al., 2013a). Hasta la actualidad, los estudios de toxicidad realizados en modelos animales, demuestran la biocompatibilidad de las partículas de óxido de hierro a las concentraciones y vías de administración utilizadas en clínica.

En este contexto, los estudios de hemotoxicidad y biocompatibilidad en sangre de las NPMs, cobran vital importancia, teniendo en cuenta que este es el primer fluido al que se exponen las partículas luego de su administración intravenosa. Sin embargo no existen muchos trabajos que aborden la hemotoxicidad asociada a tratamientos *in vivo* con nanopartículas magnéticas; a pesar de que la mayoría de estas nanoformulaciones están diseñadas para su administración sistémica en la práctica clínica. Por otro lado, tampoco existen ensayos estandarizados para el análisis *in vitro* de estos parámetros. Esta situación aumenta la complejidad de la interpretación directa de dichos resultados, debido a las diferencias entre las condiciones experimentales inter-ensayo; como pueden ser: (i) el origen biológico de la sangre, (ii) tiempo y condiciones



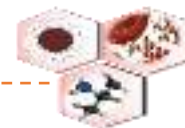
de almacenamiento, así como (iii) variaciones en los tiempos de incubación de la misma con las partículas y (iv) los métodos de separación utilizados.

Los resultados publicados, tanto *in vitro* como *in vivo*, relacionados con el efecto hemolítico de las partículas y su influencia en los procesos de coagulación sanguínea, en general, no muestran afectaciones importantes en los parámetros hematológicos y factores de la coagulación luego del tratamiento con nanopartículas de hierro (Chouly et al., 1994; Ali et al., 2013; Ruiz et al., 2015). Es importante destacar que existen evidencias empíricas que revelan una fuerte influencia del recubrimiento químico en los efectos potenciales de las NPMs sobre la coagulación sanguínea. En este sentido se ha reportado que nanopartículas funcionalizadas con DMSA o polímeros como la polivinil piridina pueden inducir un fuerte efecto anticoagulante *in vitro* (Ali et al., 2013; Ruiz et al., 2015).

Todas estas cuestiones imponen el estudio detallado de las interacciones de las NPMs con los componentes celulares y no celulares (plasma) de la sangre, como uno de los pasos en el entendimiento de la toxicidad, farmacocinética, estabilidad y penetración de estos sistemas nanoparticulados, así como la influencia de la química en la superficie de las NPMs en la modulación de estos parámetros.

2.6 Formación de la proteína corona (CP)

La comprensión de los mecanismos que median la interacción de las NPMs con los sistemas biológicos es la clave para su aplicación segura y eficiente en biomedicina. Durante la administración intravenosa, la sangre es el primer entorno fisiológico con que interacciona el nanomaterial. Una vez que las partículas entran en contacto con el biofluido, se inicia la “competencia” entre las diferentes biomoléculas por la unión a su superficie. Este proceso es altamente complejo de estudiar, dado el sinnúmero de posibles combinaciones de macromoléculas que pueden encontrarse como resultado de esta interacción. El plasma sanguíneo, por ejemplo, contiene varios miles de proteínas diversas, con una diferencia de 12 órdenes de magnitud en la concentración de las mismas, además de los lípidos disponibles (Monopoli et al., 2011). En este sentido, los estudios coinciden en que la mayoría de las biomoléculas unidas a la

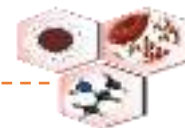


superficie de las nanopartículas son de naturaleza proteica. Esta interacción en particular es una de las más estudiadas, por el rol protagónico de las proteínas plasmáticas en los diferentes procesos de biodistribución y aclaramiento de las sustancias circulantes en sangre. A este complejo nano-biomolecular de proteínas adsorbidas a la superficie de las partículas se le ha denominado corona de proteínas (CP), aunque recientemente se han reportado cantidades minoritarias de lípidos (Rahman, 2013).

La composición de la CP es altamente dinámica y dependiente del ambiente biológico inicial al que se exponen las partículas (sangre, líquido intersticial, etc.) y el tiempo de duración de la exposición. Su formación es el resultado del equilibrio y competencia entre las distintas proteínas adsorbidas al nanomaterial. En este proceso, las partículas pierden su “identidad sintética” y adquieren una “identidad biológica”. Dicha corona de proteínas es la verdadera superficie interactiva que es presentada al sistema biológico y a la diana terapéutica (Figura 5a). (Monopoli et al., 2012).

Las interacciones nanopartículas-proteínas pueden ser de baja o de alta afinidad. Las de baja afinidad suelen estar en mayor proporción y se intercambian rápidamente (“soft corona”/corona de unión débil). Las de alta afinidad permanecen unidas más tiempo, de manera distintivamente estable (“hard corona”/corona dura) (Lundqvist et al., 2011; Monopoli et al., 2012; Monopoli et al., 2013; Pearson et al., 2014). Como resultado de esto, la capa de proteínas cambiará en el tiempo, a medida que las nanopartículas se distribuyen en los sistemas biológicos (Figura 5b).

El fenómeno de la formación y composición de la CP ha sido discutido durante los últimos años, concordando en que las propiedades fisicoquímicas del nanomaterial (tamaño, forma, composición y carga superficial) son claves en la modulación de sus interacciones biológicas. Conseguir evaluar esto hasta la fecha es un gran desafío, entre otras razones, por la alta complejidad de los fluidos biológicos, donde la presencia de proteínas mayoritarias dificulta la detección de otras minoritarias. Estudios con nanopartículas de oro coloidal (Dobrovolskaia et al., 2009), sílica, poliestireno (Monopoli et al., 2011) y óxido de hierro (Sakulkhu et al., 2015) han



demostrado que las nanopartículas interactúan fuertemente con albúmina, fibrinógeno, γ -globulina, histonas e insulina, existiendo efectos sobre esta interacción al variar el tamaño y recubrimiento químico de las partículas (Nel et al., 2009). Diferentes publicaciones científicas han descrito la manipulación de ciertos parámetros de la superficie de la nanopartícula como una estrategia para controlar las interacciones de alta o baja afinidad.

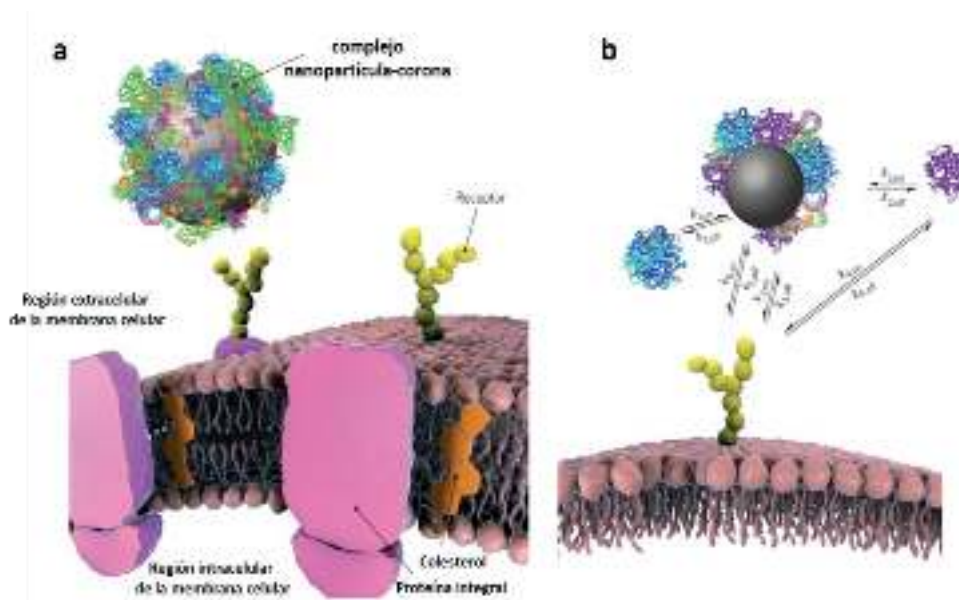
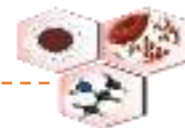


Figura 5. Representación esquemática del complejo nanopartículas- proteínas y su interacción celular (a) Reconocimiento celular del complejo nano-biomolecular en el ambiente biológico. (b) Dinamismo de las interacciones nanopartículas-proteínas en la formación de la proteína corona y su interacción con la máquina celular. *Adaptado de (Monopoli et al., 2012)*

El estudio de la influencia de estos parámetros físico-químicos en la formación de esta nueva “identidad biológica” de las partículas, va a determinar sus respuestas fisiológicas, tales como aglomeración, absorción y transporte celular, bioacumulación y efectos tóxicos (Dobrovolskaia et al., 2009; Monopoli et al., 2011; Monopoli et al., 2012; Albanese et al., 2014; Wan et al., 2015). Se pueden citar además efectos debidos a cambios en el balance de hidrofobicidad/hidrofilicidad, la carga y la forma de las nanopartículas (Sakulkhu et al., 2015).

2.6.1 Implicaciones biológicas

La interacción de las proteínas con las nanopartículas, puede influir notablemente en su eficacia en aplicaciones biomédicas (Amiri et al., 2013; Behzadi et al., 2014; Gibbons et al., 2015). Una de las razones, ya antes mencionada, se asocia al hecho de

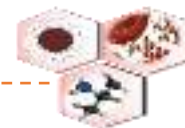


que estas proteínas que interactúan con las nanopartículas pueden ser la clave en los fenómenos de compatibilidad biológica, farmacocinética y toxicidad de las mismas (Dell'Orco et al., 2012; Lee et al., 2015).

En este sentido, las proteínas plasmáticas que se unen a la superficie de las nanopartículas pueden afectar su tamaño hidrodinámico e influir en el reconocimiento por las células del sistema inmune y el sistema fagocítico mononuclear (Lundqvist et al., 2008). En algunos casos, este aumento del tamaño resulta beneficioso, pues partículas muy pequeñas (<4 nm) se excretan prontamente mediante filtración renal (Kwon et al., 2008). Por otro lado, si el aumento es muy grande (>100 nm), la eficacia terapéutica de las NPMs puede verse disminuida así como modificada su toxicidad (Pearson et al., 2014).

Por otro lado, la interacción de proteínas con las NPMs también puede traer consigo otros problemas asociados al efecto que estas nanopartículas pueden tener sobre la conformación y actividad de dichas biomoléculas. La interacción de las nanopartículas con las proteínas puede generar plegamientos anómalos, modificación química de aminoácidos y agregación de proteínas pudiendo producir efectos nocivos o beneficiosos para la salud (Mahmoudi et al., 2011; Wan et al., 2015).

La corona biomolecular puede participar también en la modulación de los perfiles de toxicidad e inmunogenicidad de las nanopartículas dependiendo del tipo de nanopartícula y por ende, de las proteínas unidas al mismo (Mahmoudi et al., 2012; Lee et al., 2015). En condiciones fisiológicas la unión de nanopartículas a proteínas séricas, durante el tiempo de vida de la terapia, puede definir la respuesta biológica, influyendo sobre la captación celular, acumulación en órganos y rutas de eliminación. Las opsoninas presentes en la corona pueden crear una señal molecular, reconocida por el sistema inmune y activar la internalización de partículas, pudiendo ser claves en el destino del nanomaterial (Aggarwal et al., 2009). También han sido descritas diferentes apolipoproteínas que facilitan el paso de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica (Deng et al., 2009). Por lo que, en general, estas proteínas plasmáticas pueden jugar un papel determinante en la localización subcelular o en la



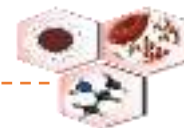
acumulación preferencial en tejidos, lo cual es un factor clave en el tratamiento y detección de enfermedades.

Diferentes estudios han detectado también proteínas del complemento y fibrinógenos en la superficie de las partículas sin observar efectos sobre la agregación plaquetaria, cambios en la coagulación o activación del complemento (Dobrovolskaia et al., 2014). Pese a lo reportado no se deben descartar posibles efectos trombogénicos que puedan desencadenar ciertos nanomateriales con superficie polianiónica, al activar los factores XII y XI, iniciadores de la cascada intrínseca de coagulación (González et al., 2008), ya que al momento de diseñar un fármaco sobre la base de un nanomaterial se debe buscar cierta hematocompatibilidad para evitar estos posibles fenómenos.

2.7 Procedimientos para el estudio de la estructura y composición de la CP

La composición y estructura de la corona de proteínas, en general, es caracterizada por cinco parámetros: (i) el espesor y densidad, (ii) la identidad y cantidad, (iii) el arreglo y orientación, (iv) la estructura y (v) la afinidad; que definen la interacción del nanomaterial con el ambiente fisiológico. El espesor y densidad de la corona de proteínas determina el tamaño global del nanomaterial y exposición de la superficie subyacente. La identidad y cantidad proteica adsorbida explica las posibles interacciones biológicas y las principales fuerzas que rigen la unión. El arreglo y la orientación determinan la accesibilidad para potenciales uniones y dominios catalíticos. La estructura influye en la actividad de la proteína y su interacción con otras biomoléculas. Finalmente, la afinidad de las proteínas al nanomaterial determina si la unión permanece en el tiempo o se disocia por las interacciones biofísicas durante su paso por el fluido biológico (Walkey and Chan, 2012).

Las técnicas para estudiar la composición y estructura de la corona de proteínas pueden ser divididas en dos grandes grupos *in situ* o *ex situ*. En las técnicas *in situ*, la corona proteica es medida mientras el nanomaterial se dispersa en un ambiente fisiológico. Sin embargo estas técnicas son limitadas en número y típicamente proporcionan menor cantidad de información. La mayoría de las medidas realizadas en la actualidad son *ex situ* (Tabla 2) y requieren el aislamiento del nanomaterial con

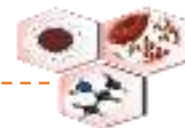


el complejo proteico que lo rodea fuera del ambiente fisiológico (Walkey and Chan, 2012; Walkey et al., 2014; D. Docter et al., 2015).

Tabla 2. Principales técnicas ex situ utilizadas en la determinación de la estructura y composición de la CP. Tomado de (Walkey and Chan, 2012; D. Docter et al., 2015).

Parámetros	Técnicas
<i>Espesor</i>	Dispersión de luz dinámica, Centrifugación-sedimentación diferencial, Ultracentrifugación analítica Cromatografía de exclusión molecular, Microscopía electrónica de transmisión y barrido, Espectroscopía de correlación fotónica
<i>Densidad</i>	Ensayos colorimétricos de proteínas
<i>Identidad y Cantidad</i>	Electroforesis unidimensional y bidimensional, Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución
<i>Conformación</i>	Dicroísmo circular, Apagamiento (quenching) de la fluorescencia, Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier, Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, Simulación computacional
<i>Afinidad</i>	Cromatografía de exclusión molecular, Resonancia plasmónica de superficie, Calorimetría isothermal de titración

En los últimos tiempos, también ha ganado popularidad en este campo, la simulación *in silico* de las interacciones nanopartículas-proteínas, como una metodología complementaria a las técnicas experimentales. Esta estrategia, ampliamente popularizada para predecir el plegamiento proteico e interacciones proteína-proteína, ha sido adaptada con éxito al estudio de la adsorción de proteínas a biomateriales, y más recientemente a nanomateriales. Aunque todavía es una metodología en ascenso en este sentido, tiene entre sus principales ventajas, la obtención de información sobre la orientación de la proteína y su estructura con una alta resolución espacial y temporal (Latour, 2008; Makarucha et al., 2011).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Todos los reactivos y solventes utilizados en la síntesis de las nanopartículas y estudios de proteómica presentaban un grado de pureza analítica superior al 98%. Estos fueron adquiridos en distintas casas comerciales (MERCK, Sigma, Fluka, Aldrich), de acuerdo a los requerimientos de calidad establecidos para los protocolos realizados.

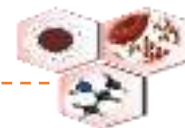
Para los estudios de liberación de proteínas se prepararon además las siguientes soluciones: *a)* Hepes 50 mM en N-octil-3-D-glucopiranosido (OGP) 0,1% pH 7, *b)* acetato de sodio (NaAc) 100 mM en OGP 0,1% pH_(S) 4 y 5, *c)* citrato de sodio 50 mM en OGP 0,1% pH 3, *d)* isopropanol 33,3% /acetonitrilo 16,7% /ácido trifluoracético 0,1% pH 1 y 2 y *e)* OGP 5mM en Bicarbonato de amonio (AmBic) 50mM pH 8.

El plasma utilizado en los ensayos *in vitro*, se obtuvo de ratas hembras, de la línea Wistar, entre 10 y 13 semanas de edad, con un peso corporal de 300 ± 20 g, adquiridas en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, España). Los animales se mantuvieron y manipularon acorde a lo aprobado por el comité de ética para el uso y cuidado de animales de laboratorio de esta institución.

2.2 Preparación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro

2.2.1 Síntesis

Las NPMs de óxido de hierro fueron obtenidas mediante el método de descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro en presencia de surfactantes. Para ello, se mezclaron 20 mmol del complejo de coordinación acetilacetonato de hierro (III) (Fe (acac)₃) con 1,2-hexadecanodiol 100 mmol, ácido oleico 60 mmol y oleilamina 60 mmol. La mezcla de reacción se disolvió en 200 mL de 1-octadeceno en un balón de reacción de 500 mL y fue calentada bajo una corriente de N₂ hasta 200°C, manteniendo la temperatura durante 2 horas. Tras la etapa de estabilización a 200 °C, se aumentó la temperatura de la reacción hasta el punto de ebullición del disolvente (310°C) durante 1 hora, para obtener partículas de 10 nm de diámetro. Las nanopartículas se precipitaron con etanol en varios ciclos de lavado (15 minutos a



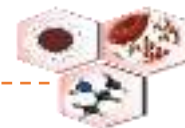
7167 gravedades (g)) para eliminar el disolvente y los surfactantes no unidos. El precipitado sin impurezas se redispersó en hexano para obtener el ferrofluido.

2.2.2 Modificación superficial

La transferencia de las nanopartículas a medio acuoso se realizó mediante una reacción de intercambio de ligandos del ácido oleico de la superficie de las mismas por el ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Con este objetivo se floclaron con etanol 50 mg de partículas y se resuspendieron en 40 mL de tolueno, posteriormente se añadió una disolución de 90 mg de DMSA disuelto en 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). La mezcla resultante se mantuvo en baño ultrasónico durante 5 minutos y se agitó mecánicamente en una noria durante 48 horas. Una vez terminada la agitación se lavaron y centrifugaron sucesivamente las partículas con etanol. A continuación, las partículas en agua se redispersaron y se añadieron gotas de hidróxido de sodio (NaOH) para reducir el diámetro hidrodinámico (Dh) de la suspensión. Finalmente se dializó la suspensión durante 72 horas y se filtró a presión, utilizando un filtro de 0,22 μm .

La conjugación de las nanopartículas a polietilenglicol se realizó mediante la activación de los grupos carboxilos del DMSA con carbodiimida (EDC), que permitió la posterior conjugación del DMSA a los grupos amino del PEG.

En este estudio, se emplearon dos polímeros basados en PEG con diferente peso molecular: O-(2-aminoetil) polietilenglicol, 2000 Da (PEG-(NH₂)₂(2000)) y O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, 20 000 Da (PEG-(NH₂)₂(20000)). La reacción se efectuó en un baño ultrasónico refrigerado, empleando 100 mg de NPMs que se mezclaron con 40 mg de los derivados de PEG. La cantidad total de EDC empleada en la reacción (10 mg) se dividió en 5 alícuotas que se añadieron cada dos horas. La última adición se realizó 12 horas después del inicio de la reacción. La relación molar entre grupos COOH/ grupos NH₂/ EDC fue 1:1,5:1. El pH de la reacción se ajustó a 6. La mezcla se mantuvo en baño ultrasónico durante 30 h a 25°C y finalmente se dializó durante 72 horas para eliminar el polímero no unido.



2.3 Caracterización físico- química de las nanopartículas magnéticas

2.3.1 Tamaño y morfología

La microscopía electrónica de transmisión (TEM siglas en inglés) se utilizó para estudiar la morfología y homogeneidad en tamaño de las partículas. Las imágenes de las nanopartículas se obtuvieron en un microscopio JEOL 2000 FXII, con una diferencia de potencial de 200 kiloelectronvoltio (KeV) y resolución de 3Å.

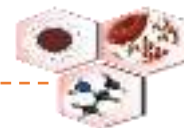
Para visualizar las nanopartículas en el TEM se depositó una gota diluida de las NPMs en hexano (recubiertas de ácido oleico) sobre una rejilla de cobre y se dejó secar en una estufa a 50°C. El análisis del tamaño de partícula de cada muestra se realizó midiendo la longitud más grande de cada partícula, para lo que se tomó como referencia un mínimo de 200 nanopartículas, con la ayuda del programa libre Gwyddion (<http://gwyddion.net/>).

2.3.2. Diámetro hidrodinámico y potencial ζ

La técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS siglas en inglés) se utilizó para la caracterización del diámetro hidrodinámico (D_h), la estabilidad coloidal de las nanopartículas en función del grado de polidispersidad de la muestra (PDI siglas en inglés), así como la determinación de la carga superficial aparente de las mismas. Las mediciones se realizaron con el equipo de dispersión de luz NANO SIZER ZS de Malvern Instruments.

La medición de los diámetros hidrodinámicos de las suspensiones se realizó a pH 7 en medio acuoso, utilizando cubetas de 1cm con alrededor de 3mL de muestra, debidamente diluida en caso necesario.

La evolución del potencial ζ de las nanopartículas se siguió para distintos valores de pH (2-8), en cubetas plásticas de 1cm con un electrodo acoplado, encargado de generar una diferencia de potencial. Para ello se utilizó una solución de KNO_3 0,01 M, a la que se añadieron secuencialmente soluciones de KOH o HCl 0,01 M para lograr la variación del pH del medio deseada.



2.3.3 Composición química superficial

El recubrimiento de las nanopartículas se caracterizó mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, siglas en inglés) a partir de la identificación de los grupos funcionales en su superficie. El Análisis Termogravimétrico (TGA, siglas en inglés) permitió cuantificar el recubrimiento orgánico luego de los diferentes procesos de síntesis y posterior modificación superficial de las nanopartículas.

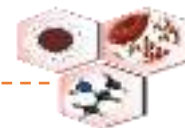
Para las mediciones de FTIR, las muestras se prepararon al 2% en peso de nanopartículas en bromuro de potasio (KBr) y se compactaron hasta formar la pastilla que se emplea para el análisis. El registro de los espectros se llevó a cabo en un espectrofotómetro con transformada de Fourier Nicolet 20 SXC, con resolución analítica de 2cm^{-1} , barriendo la región de energías comprendida entre 3600 y 300 cm^{-1} .

La cuantificación por TGA se realizó utilizando 10 mg de cada muestra, previamente secadas a 50°C en la estufa. Para el análisis se utilizó un equipo Seiko TG/ATD 320 U, SSC 5200. Los análisis se llevaron a cabo desde una temperatura inicial de 20°C hasta una temperatura final de 1100°C con un gradiente de subida de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y en presencia de un flujo de aire de $100\text{ mL}/\text{min}$ para ayudar a la eliminación del residuo de la muestra.

2.3.4 Características magnéticas

El Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM, siglas en inglés) permitió evaluar las propiedades magnéticas de las nanopartículas.

Las curvas de imanación de las NPMs se registraron a 250K después de aplicar un campo entre 1 y 5 tesla (T). El modelo de magnetómetro de muestra vibrante utilizado para la caracterización magnética fue el VSM, MLVSM9 MagLab 9 T , Oxford Instruments. La caracterización de las medidas magnéticas se realizó depositando una pequeña cantidad de la muestra en polvo (70 - 100 mg) en el interior de una cápsula de gelatina. El polvo se compactó al fondo de la cápsula de gelatina introduciendo un



algodón, permitiendo así que quedara inmovilizado. Por último, se colocó en un tubo de kapton (tipo especial de material adhesivo que no genera señal magnética) y se introdujo en el interior del magnetómetro.

2.4 Ensayos *in vitro*

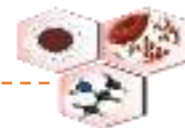
2.4.1 Formación de la “corona proteica” en torno a las nanopartículas magnéticas

Muestras de sangre de 10 ratas Wistar hembras se colectaron (en tubos de 3mL con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%, para prevenir la coagulación) y se centrifugaron a 57g durante 5 minutos. El precipitado obtenido, que contenía el componente celular sanguíneo, se descartó. El sobrenadante (plasma) de las 10 muestras se recuperó y mezcló homogéneamente y finalmente se conservó a -80°C para su uso posterior. Una solución de NPMs se preparó a partir de 300 μg de nanopartículas en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) a una concentración final de 1mg/mL. La mezcla de plasma obtenida (500 μL) se incubó en movimiento con esta solución, durante 10, 20 y 30 minutos respectivamente, a 37°C . Las nanopartículas con las proteínas unidas se colectaron por separación magnética transcurridos los tiempos de incubación. El precipitado con el complejo NPMs-proteínas se lavó tres veces con una solución estéril de 2 mL de SSTF, para eliminar las proteínas no adsorbidas. El precipitado final obtenido fue procesado para su análisis.

La evolución del tamaño de las nanopartículas y sus propiedades coloidales se caracterizó por DLS utilizando un Nanosizer ZS (Malvern Instrument).

2.4.2 Separación de las proteínas plasmáticas adsorbidas a las NPMs

Las proteínas plasmáticas se eluyeron secuencialmente de la superficie de las NPMs mediante lavados con tampones a diferentes valores de pH (desde pH fisiológico 7, utilizando secuencialmente y en orden ascendente de acidificación del medio los $\text{pH}_{(S)}$ 3,4 y 5 hasta un límite de $\text{pH}_{(S)}$ 1 y 2, ver acápite 2.1).



2.5 Caracterización del complejo proteico CP

2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, siglas en inglés) se utilizó para estudiar el perfil de unión de las proteínas plasmáticas a la superficie de las nanopartículas y a la vez reducir la complejidad de la muestra antes del análisis por espectrometría de masas (MS, siglas en inglés).

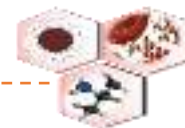
Las proteínas eluidas en los diferentes tampones utilizados se aplicaron a una electroforesis en gel de acrilamida al 10% a. La preparación de cada uno de los geles empleados se realizó según la siguiente proporción: el gel separador se preparó en un volumen de 10mL (3,4 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%/0,8% peso/ volumen (p/v), 2,6 mL de Tris 1,5 M pH 8,8, 100 μ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 3,8 mL de agua destilada, 0,1mL de persulfato de amonio (PSA) 10%, 0,01mL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador se preparó a razón de 5mL (0,67 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%/0,8% p/v, 1,25mL de Tris 1,5 M pH 6,8; 0,05mL de SDS 10%; 3mL agua destilada; 0,05mL de PSA 10%; 0,005 mL de TEMED).

El volumen de las muestras aplicadas fue de 20 μ l por pozo, preparadas con 15 μ l de muestra y 5 μ l de solución del tampón de aplicación, el indicador de frente de corrida utilizado fue bromofenol azul, y se aplicó un voltaje constante de 120V.

Para la visualización de las proteínas en la corrida electroforética se procedió a la tinción con el reactivo azul de Comassie R-250 (CBB). Las imágenes digitales de los geles se obtuvieron con un escáner ScanJet 4c/T (Hewlett Packard) y luego se analizaron con el software Image J v1.32.

2.5.2 Espectrometría de masas

La identificación de las proteínas plasmáticas colectadas en las fracciones de interés (soluciones a) y b), ver acápite 2.1) se realizó utilizando la técnica de espectrometría de masas, a partir de la metodología que se describe a continuación.



Precipitación y cuantificación de las muestras

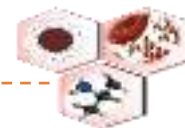
Las bandas de proteínas del gel se precipitaron por el método de cloroformo/metanol (Wessel-Fluegge, 1984). Las proteínas obtenidas se incubaron en el tampón de digestión y se cuantificaron con el reactivo de PIERCE (660nm) (Thermo Scientific) en urea 8M, bicarbonato de amonio ((NH₄) HCO₃) 25 mM.

Reducción y alquilación de las cisteínas y digestión de las proteínas

Cada muestra se digirió con tripsina (razón 1:20 enzima/proteína) (Ferrer et al., 2004). Previamente se realizó la reducción con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP)) 50mM y alquilación con metil-metanotiosulfonato (MMTS) 20mM. El digerido se purificó con una columna SEP-PAK C18 previo al análisis por espectrometría de masas.

Análisis por nanoHPLC acoplado a espectrometría de masas

El análisis por cromatografía de fase reversa acoplada en línea a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS) se llevó a cabo con un 1D-nano LC (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA) acoplado a un espectrómetro de masas ESI-MSMS 5600 TRIPLE-TOF de alta velocidad (AB SCIEX, Foster City, CA). La muestra se cargó en una precolumna RP (siglas en inglés) C18 Acclaim PepMap 100, 100 µm x 2 cm, tamaño de partícula: 5 µm y tamaño de poro: 100 Å (Thermo Scientific) con la solución tampón A (0,1% de ácido fórmico (AF) en agua desionizada) a 2 µL/min. Seguidamente la pre-columna se conectó en línea con la columna analítica RP C-18 nanoACQUITY, tamaño de partícula: 75 µm x 15 cm, tamaño de partícula: 1,7 µm y tamaño de poro: 130 Å; (Waters)). La separación de los péptidos se realizó a un flujo de 250 nL/min bajo las condiciones del gradiente de elución, para lo que se utilizó la solución tampón A y AF 0.1% en acetonitrilo como solución tampón B. Las muestras obtenidas del lavado con la solución a) (ver acápite 2.1) se separaron a 200 minutos y aquellas obtenidas con la solución b) (ver acápite 2.1) se separaron a 60 minutos. El volumen de inyección fue de 5 µL.



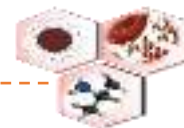
El espectrómetro de masas fue operado en el modo dependiente de datos (IDA, siglas en inglés) con el programa Analyst TF 1.7 (AB SCIEX, USA), donde alterna automáticamente entre el modo MS y el modo MS/MS para las 10 señales más intensas). La fuente de nano-nebulización fue equipada con un emisor fusionado con sílice PicoTip (10 μm x 12 cm, New Objective, Woburn, MA). La fuente de los iones del MS se operó en modo de ionización positivo a la temperatura del calentador de interfaz (IHT) de 150 °C con una diferencia potencial (ISVF) de 2300V. Se usó una cortina de gas (CUR) 35 y una fuente de iones gas 1 (GS1) 15. Para los parámetros del IDA se realizó un barrido MS en rango de masas de 350 a 1250 Da en 0.25 s seguido de 35 barridos MS/MS de 100 ms en un rango de masas de 100 a 1800 Da (tiempo total del ciclo: 3.8 s). Se utilizó como criterio de análisis, las señales de iones con una relación masa/carga mayor de 350 y menor 1250 con estado de carga de 2 a 5 y un umbral de abundancia de más de 90 conteos (cps).

Programas de identificación empleados

Los datos obtenidos se procesaron con el programa PeakView (versión 1.1, AB Sciex) para generar los archivos MGF que se usaron como entrada para ejecutar las búsquedas frente a la base de datos UNIPROT acotada a la taxonomía *Rattus norvegicus* con 7932 entradas de genes codificantes de proteínas. La identificación de las proteínas, basado en los espectros MS/MS, se realizó usando el programa Mascot versión 2.5 (Matrix Science, London, UK). Entre los parámetros de búsqueda se incluyó como modificación fija la alquilación de las cisteínas, beta-metilolación de cisteínas y como modificaciones variables, la oxidación de las metioninas. Se permitió una tolerancia en el error de la masa de los péptidos para el precursor de ± 25 ppm y 0,05 Da para sus fragmentos. Sólo proteínas con al menos dos péptidos identificados fueron consideradas como significantes.

Cuantificación relativa de proteínas

La cantidad de cada una de las proteínas identificadas en la superficie de las NPMs se evaluó semi-cuantitativamente aplicando el método de conteo espectral (siglas en inglés). Las cantidades de SpC normalizadas de cada proteína identificada en el estudio de LC-MS/MS se calcularon aplicando la siguiente ecuación:



$$NSpCk = \frac{(SpC / PM) k}{\sum_{i=1}^n (SpC / PM)_i} \times 100$$

(Sakulphu *et al.*, 2015)

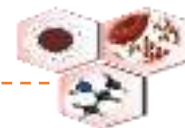
donde NSpCk es el porcentaje normalizado de SpC para la proteína k; SpC representa el conteo espectral de la proteína k identificada, visto como el número total de péptidos identificados para dicha proteína y PM es el peso molecular (en kDa) de la proteína k.

2.6 Procesamiento de los datos

El cálculo del tamaño medio de las nanopartículas y su grado de polidispersidad (σ) se realizó ajustando los datos a una función de distribución logarítmica normal con el empleo del programa Origin Pro 8.

Los valores de diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de las suspensiones acuosas de NPMs modificadas con DMSA y PEG se obtuvieron a partir del promedio de 3 réplicas por muestra. El valor de Dh se calculó como el promedio de las medidas de intensidad de cada una de las muestras analizadas. El PDI se calcula como la desviación estándar entre el valor dado por triplicado para cada muestra, dividido entre la media de las réplicas para cada muestra en cuestión.

El intervalo de confianza para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas fue de un 95% ($p < 0.05$).



3. RESULTADOS

3.1 Síntesis y caracterización de NPMs de óxido de hierro con potenciales aplicaciones biomédicas

3.1.1 Obtención de nanopartículas por el método de descomposición térmica

Las nanopartículas magnéticas de óxido hierro empleadas en este trabajo, se sintetizaron mediante el método de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en medio orgánico. La caracterización de las nanopartículas obtenidas se centró en el análisis del núcleo de óxido de hierro, recubrimiento superficial y propiedades coloidales de las mismas.

La Figura 6a muestra la microfotografía de TEM correspondiente a las NPMs recubiertas con ácido oleico y dispersadas en hexano. Como puede observarse, las nanopartículas obtenidas por este método son altamente homogéneas en tamaño y forma y presentan una morfología aproximadamente esférica.

Los diámetros de las nanopartículas medidos a partir de un estudio poblacional de las microfotografías de TEM ($n=200$), se ajustaron a un modelo de distribución normal o gaussianana. El histograma de tamaño (Figura 6b) evidencia que las NPMs presentan un diámetro medio de 10 nm y un elevado índice de monodispersidad ($\sigma=0.15$).

La curva de magnetización (Figura 6c), como medida de las propiedades magnéticas, fue obtenida a una temperatura de 250K. Para ello se utilizó una muestra de NPMs revestidas con ácido oleico en una solución de hexano. Nuestros resultados demuestran que las nanopartículas presentan un comportamiento superparamagnético, con una elevada magnetización de saturación (M_s) de 67 emu/g.

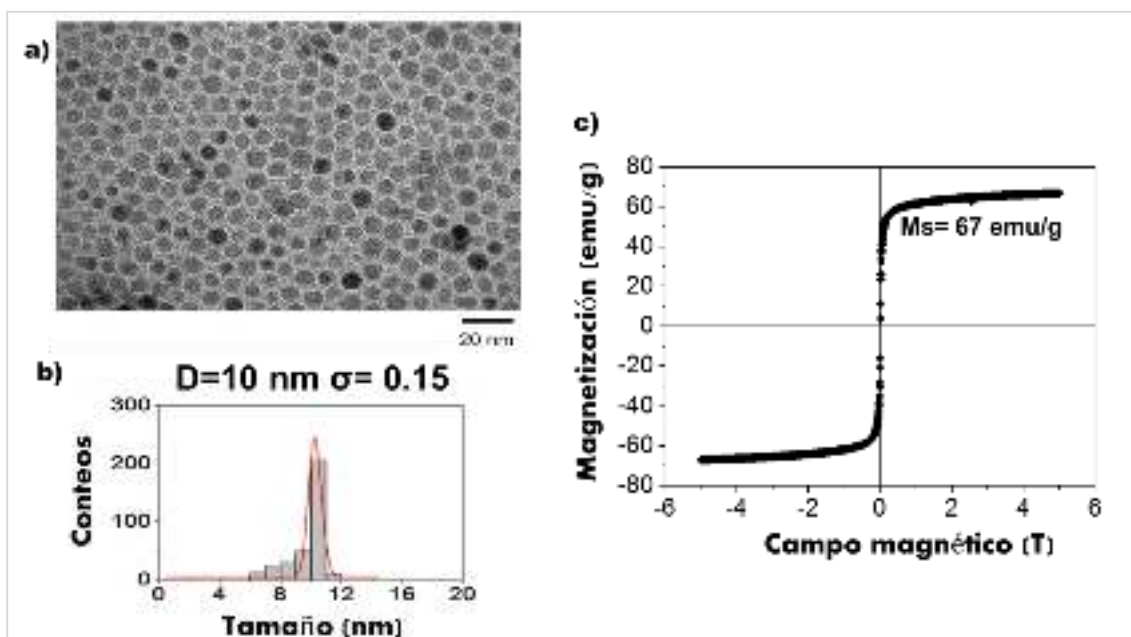
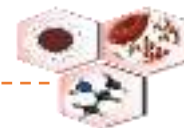
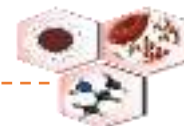


Figura 6. Propiedades de NPMs de óxido de hierro obtenidas por el método de descomposición térmica en medio orgánico. (a) Imagen de TEM de nanopartículas recubiertas con ácido oleico en hexano (escala: 20nm) **(b)** Histograma y distribución (línea roja) de tamaños de las partículas obtenidas del análisis de TEM **(c)** Curva de magnetización a 250K de las nanopartículas revestidas de ácido oleico y dispersadas en hexano. Estos resultados son representativos de tres experimentos.

3.1.2 Modificación superficial con DMSA y conjugación a diferentes derivados de PEG

Las NPMs obtenidas por el método de descomposición térmica, tras la síntesis quedan recubiertas de ácido oleico, por lo cual presentan un fuerte carácter hidrofóbico, incompatible con posteriores usos biomédicos. La eliminación del surfactante y la transferencia a medio acuoso de las partículas, se realizó mediante una reacción de intercambio de ligandos con DMSA. Esta reacción permite la sustitución del ácido oleico unido a la superficie de las nanopartículas, por el ligando hidrofílico antes mencionado.

Luego de lograr la estabilización de las NPMs en medio acuoso, se procedió a su conjugación a diferentes derivados de PEG diaminados. Con este objetivo se activaron los grupos carboxilos del DMSA que recubre la superficie de las partículas en una reacción mediada por carbodiimida, lo que permitió la formación del enlace amida con los grupos aminos del PEG. De esta manera se realizó la PEGilación de las



nanopartículas con los polímeros: O-(2-aminoetil) polietilenglicol, 2000 Da (PEG-(NH₂)₂(2000)) y O,O'-bis(2-aminoetil) polietilenglicol, 20 000 Da (PEG-(NH₂)₂(20 000)).

La eficacia de la modificación con DMSA y la conjugación a los diferentes polímeros de PEG se estudió por FTIR. Los espectros IR de las nanopartículas conjugadas a DMSA (Np-DMSA) y a las diferentes moléculas de PEG (Np-PEG-(NH₂)₂(2000); Np-PEG-(NH₂)₂(20 000)) se muestran en la Figura 7.

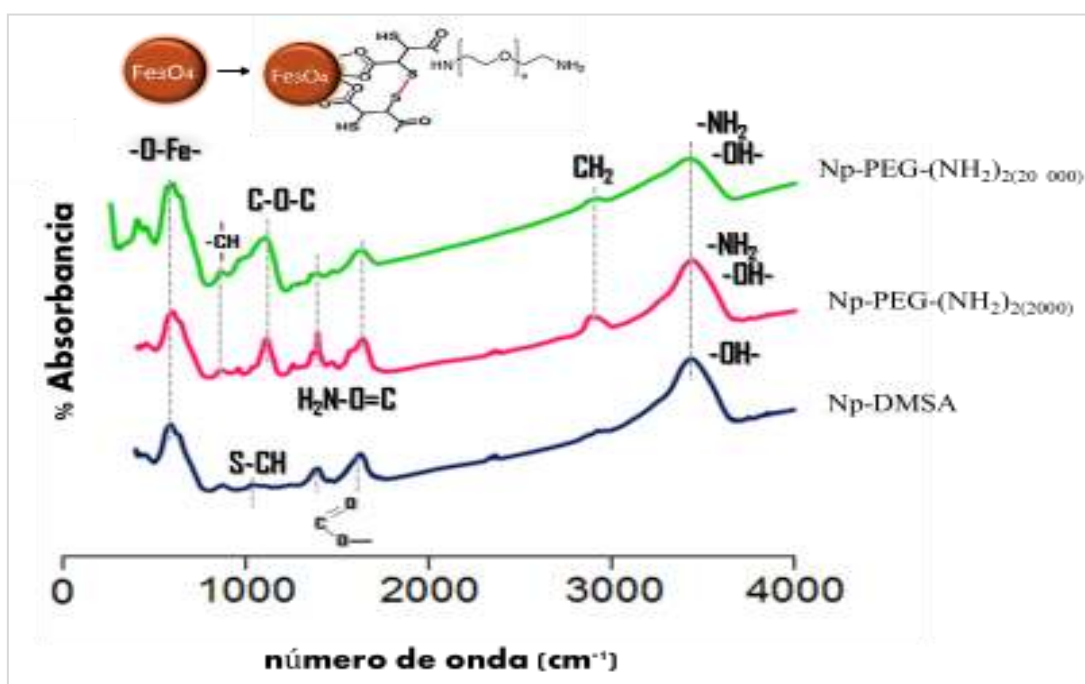
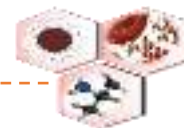


Figura 7. Espectros infrarrojos de las NPMs conjugadas a DMSA (azul), (PEG-(NH₂)₂(2000)) (rosa) y (PEG-(NH₂)₂(20 000)) (verde). Estos resultados son representativos de dos experimentos.

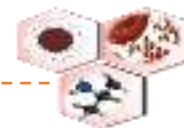
En todas las muestras analizadas es posible observar en el espectro, bandas intensas en la región de 550-600 cm⁻¹, asociadas a la vibración del enlace (Fe-O), característico del núcleo metálico de las partículas (Roca *et al.*, 2007). En la muestra de Np-DMSA, el espectro se compone además de una banda ancha entre los 3000-3500 cm⁻¹ que se asocia a la presencia de grupos -OH del agua adsorbida a la superficie de las nanopartículas. Esta vibración también es característica de grupos -NH₂ y puede observarse en las muestras conjugadas a los PEG diaminados (Hatton, 2007; Barrera *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2013b). La presencia de DMSA en la superficie de la partícula se comprueba con la aparición de una banda de absorción ensanchada de pequeña



intensidad entre 1000 y 1140 cm^{-1} debido a la vibración del enlace S-CH. La unión covalente del DMSA a las NPMs puede confirmarse por la presencia de señales en la región de 1550 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} asociadas a la vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas del enlace C=O, respectivamente.

Después de la reacción de conjugación a los polímeros, aparecen señales en la región de los 1102 cm^{-1} y 1354 cm^{-1} , características de las vibraciones asimétricas y simétricas de estiramiento del enlace C-O-C, así como la vibración fuera del plano de flexión de los enlaces C-H de las cadenas de PEG a 956 cm^{-1} (Amstad *et al.*, 2009; Amici *et al.*, 2011). Estas bandas son más ensanchadas en las NPMs conjugadas a los PEG de 20 000Da. En la muestra de Np-PEG-(NH₂)₂(2000) puede observarse una señal intensa entre 1000-1200 cm^{-1} , indicativo de la presencia de aminas alifáticas (C-N), que no es apreciable en las Np-PEG-(NH₂)₂(20 000). También se identificó un máximo entre 1556 y 1640 cm^{-1} , característico del enlace amida con grupos carbonilo, lo cual confirma su unión covalente a las NPMs (Kohler *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013b). Estas bandas son de menor intensidad en las Np-PEG-(NH₂)₂(20 000). La presencia de bandas entre 2800-2950 cm^{-1} , en las muestras conjugadas a los dos polímeros también evidencian el éxito de la unión covalente del PEG a la superficie de las Np-DMSA mediante la formación de un enlace amida (Barrera *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2013b).

La estabilidad y propiedades coloidales de las NPMs en solución, se evaluó por DLS. Para ello se realizaron medidas de radio hidrodinámico y potencial ζ en función del pH. En la Tabla 3 se resumen los valores de radio hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI = desviación estándar/ media) de las nanopartículas transferidas a medio acuoso (Np-DMSA) y modificadas con los diferentes residuos de PEG, en función de la intensidad que dispersan las partículas.



Muestras	D _h (nm)	PDI
Np-DMSA	32	0,234
Np-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)	68	0,175
Np-PEG-(NH ₂) ₂ (20 000)	50	0,260

Tabla 3. Valores de radio hidrodinámico (D_h) e índice de polidispersidad (PDI) de suspensiones acuosas de NPMs conjugadas a DMSA y diferentes polímeros de PEG. En cada caso los datos fueron obtenidos a partir del promedio de 3 réplicas por muestra. El PDI, se determinó dividiendo la desviación estándar de los valores entre el valor medio.

Para las muestras conjugadas a los distintos residuos de PEG, se observa un incremento del radio hidrodinámico de 68 nm y 50 nm (Np-PEG-(NH₂)₂(2000); Np-PEG-(NH₂)₂(20 000)) respectivamente, con respecto a las muestras modificadas con DMSA (32 nm). Estos resultados evidencian el éxito de la conjugación de las nanopartículas a DMSA y a PEG. El grado de polidispersidad (PDI) en todas las muestras se mantiene inferior a 0,30.

El análisis de la evolución del potencial ζ en función del pH permitió evaluar la carga superficial neta de las nanopartículas de magnetita recubiertas con DMSA y conjugadas luego a los diferentes PEG (Figura 8). Las NPMs modificadas con DMSA presentan valores de potencial ζ de -35 mV a pH 7. Después de la reacción de conjugación a los PEG, se observa una disminución de la carga superficial neta de las nanopartículas hacia valores entre -15 y -10 mV (Np-PEG-(NH₂)₂(2000); Np-PEG-(NH₂)₂(20 000)) respectivamente (Figura 8).

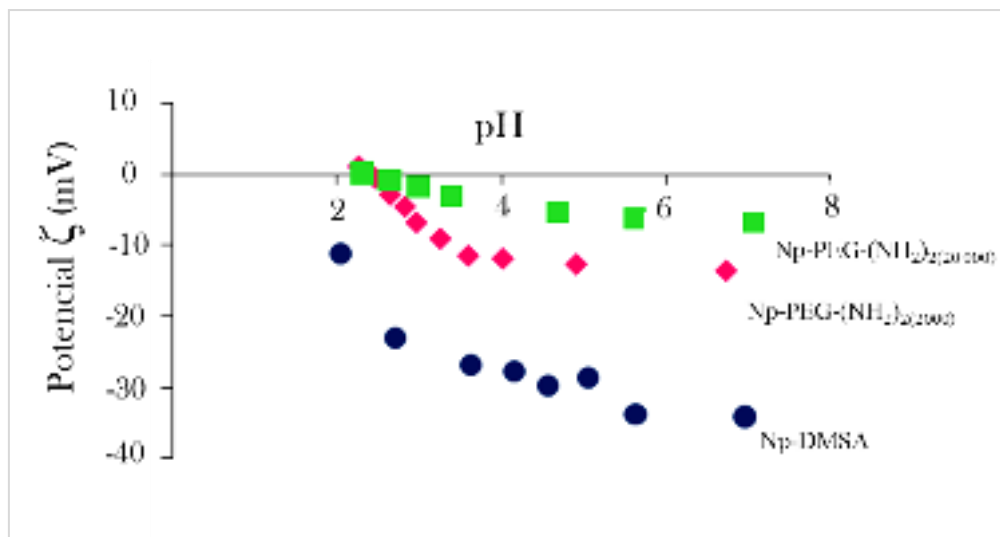
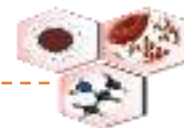


Figura 8. Evolución del potencial ζ en función del pH de las NPMs después de conjugar a DMSA (azul) y a los distintos polímeros de PEG (Np-PEG-(NH₂)₂(2000) (rosa) y Np-PEG-(NH₂)₂(20 000) (verde). El potencial ζ se calculó como el promedio de 15 medidas para cada muestra a los diferentes pH analizados. Estos resultados son representativos de dos experimentos.

El análisis termogravimétrico permitió la cuantificación de las de moléculas de PEG incorporadas a la superficie de las nanopartículas (Figura 9). La muestra de Np-DMSA evidencia una pérdida de peso de alrededor del 13%, asociado a la eliminación del agua adsorbida a la superficie y al recubrimiento con DMSA. Las muestras de Np-PEG-(NH₂)₂(2000) y Np-PEG-(NH₂)₂(20 000) presentaron una pérdida total de peso del 28% y 38% respectivamente. La cantidad de las diferentes moléculas de PEG en la superficie de las NPMs, se estableció teniendo en cuenta su área superficial y la masa molecular de cada polímero. Para las nanopartículas recubiertas con la variante polimérica PEG-(NH₂)₂(2000) se determinó la presencia de alrededor de 3 moléculas/nm², mientras que en las recubiertas de PEG-(NH₂)₂(20 000) se determinaron alrededor de 0.5 moléculas/nm².

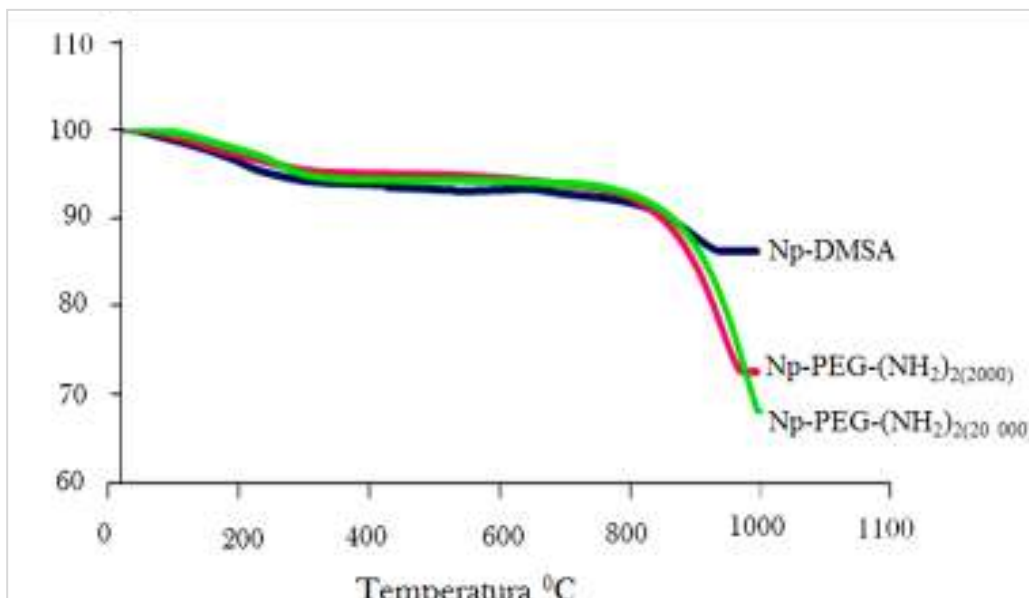
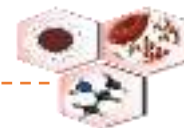


Figura 9. Análisis termogravimétrico de las muestras de NPMs modificadas con DMSA (azul) y conjugadas a diferentes PEG (Np-PEG-(NH₂)₂(2000) (rosa) y Np-PEG-(NH₂)₂(20000) (verde). Estos resultados son representativos de dos experimentos.

3.2 Estudio de la evolución del complejo NPMs-CP

En este trabajo se estudió el efecto de las propiedades físico-químicas superficiales de NPMs de óxido de hierro, en la formación del complejo proteico “proteína corona”. Para ello, NPMs recubiertas con DMSA y conjugadas a PEG diaminados de 2000 y 20000 Da, respectivamente se incubaron a diferentes tiempos, con plasma de ratas. El tiempo total del ensayo (30 min) se seleccionó asumiendo la determinación en estudios previos del tiempo de vida media ($t_{1/2}$) en sangre de las nanopartículas. Las NPMs luego de la incubación con plasma se recuperaron por separación magnética.

Teniendo en cuenta que la adsorción de proteínas debe afectar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas, se evaluó la evolución de este parámetro por DLS. La Figura 10a muestra la evolución del Dh para las diferentes muestras de NPMs, luego de la incubación con plasma a tiempos de 1, 10, 20 y 30 minutos, respectivamente. El estudio cinético demuestra que la corona proteica se forma rápidamente una vez que las NPMs se ponen en contacto con el plasma. Lo que se evidencia en el “brusco” aumento de tamaño que exhiben las nanopartículas desde el primer minuto de incubación.

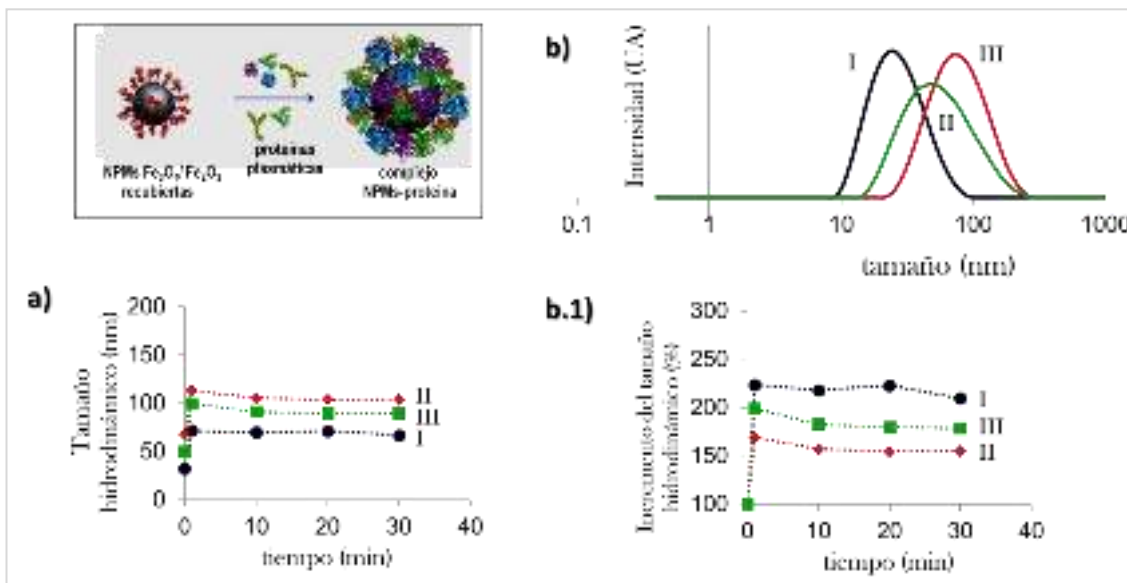
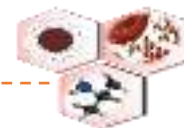
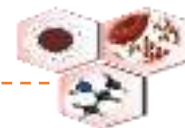


Figura 10. Estudio de la evolución del complejo NPMs-proteína corona por DLS. NPMs de óxido de hierro con diferentes recubrimientos fueron incubadas con plasma de rata a 1, 10, 20 y 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió por DLS el tamaño hidrodinámico de las muestras con el objetivo de evaluar cómo se afectaba dicho parámetro como resultado de la adsorción de las proteínas plasmáticas en la superficie de las nanopartículas. La figura (a) muestra la cinética de formación de la CP alrededor de las NPMs teniendo en cuenta la evolución del Dh a los diferentes tiempos de incubación. El gráfico (b) muestra la función de distribución de las NPMs luego de 30 minutos de incubación con plasma. La figura (c) evidencia el incremento en porcentaje del Dh de las diferentes muestras de NPMs a los tiempos de incubación fijados en el estudio. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos. [I] Np-DMSA, [II] Np-PEG-(NH₂)₂(2000), [III] Np-PEG-(NH₂)₂(20 000).

Los resultados obtenidos evidencian además, que este complejo NPMs-proteína se mantiene estable hasta al menos 30 minutos después de la incubación con plasma. La distribución de tamaños de las nanopartículas a los 30 minutos de la exposición al plasma también fue analizado (Figura 10b). Estos datos nos permiten tener una medida de la dispersión de las muestras al exponerse a un medio rico en sales y proteínas como el plasma. Como se evidencia en la Figura 10b, a pesar del incremento del diámetro hidrodinámico en las diferentes muestras de NPMs analizadas, se mantiene un buen control de la dispersión de las partículas en presencia del plasma y valores de radio hidrodinámico por debajo de 200nm. La mayor variación de este parámetro se observó para la muestra de Np-DMSA de 25 a 67 nm, evidenciado en un incremento del tamaño hidrodinámico inicial por encima del 200% (Figura 10 b.1).



3.3 Composición y caracterización de la CP

3.3.1 Caracterización de la CP por SDS-PAGE

Las diferentes muestras de NPMs separadas magnéticamente después de la incubación con plasma, se aplicaron en geles de poliacrilamida para su análisis por electroforesis SDS-PAGE. De esta manera se pudieron determinar las proteínas adsorbidas a las nanopartículas con alta o baja afinidad (“corona de unión fuerte” o “corona unión débil”, respectivamente) así como la dependencia temporal de este proceso de adsorción superficial.

Aunque el análisis se realizó utilizando tampones con una variación de pH desde 1 hasta 7, los estudios en este trabajo se centraron en las fracciones proteicas eluidas a pH 5 y 7. Puesto que, la incubación del complejo NPMs-CP con tampones de pH por debajo de 4, generó la degradación parcial de las nanopartículas, fenómeno que podía interferir tanto en las mediciones experimentales posteriores como en la correcta interpretación de los resultados en el sistema en cuestión. Por otra parte, el análisis del perfil electroforético a partir de pH 4 mostró un porcentaje muy bajo de proteínas desorbidas de la superficie de las NPMs (Anexo I). De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se escogieron sólo las eluciones correspondientes a los lavados con los tampones de pH 5 y 7, que permitían evaluar el efecto de desorción de la corona proteica, sin que se viera afectada la integridad de las nanopartículas.

La Figura 11 muestra el perfil electroforético de los geles SDS-PAGE. Como puede observarse, la fracción proteica denominada “corona de unión débil”, se corresponde con las proteínas eluidas a pH 7, a partir de una pequeña variación de la fuerza iónica del medio (Hepes 50mM OGP 0.1%, pH 7) (Figura 11a). La llamada “corona de unión fuerte” se relaciona con las proteínas eluidas a pH 5, al ser expuestas a condiciones más drásticas de pH y fuerza iónica (NaAc 100mM OGP 0.1% pH 5) (Figura 11b).

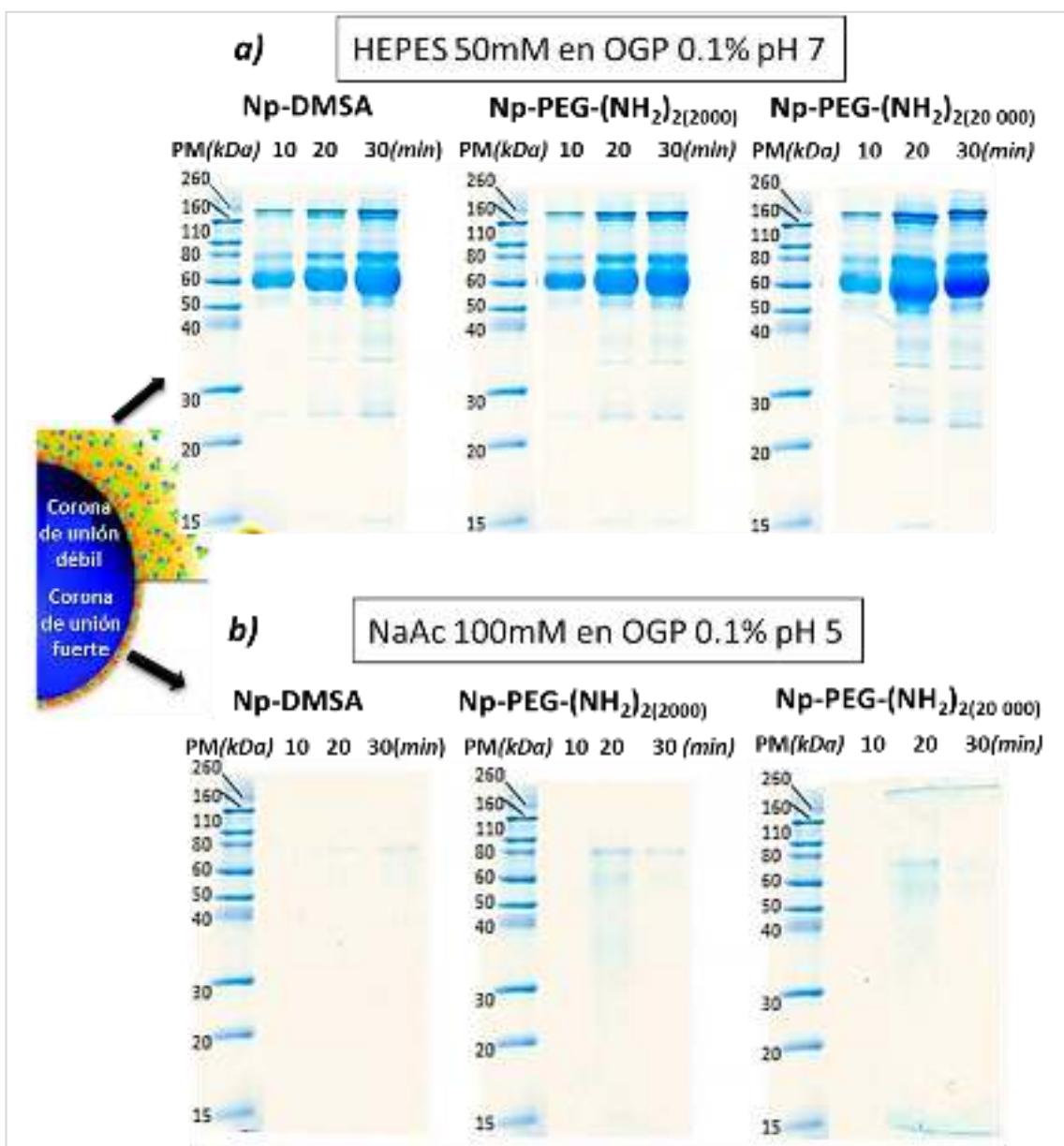
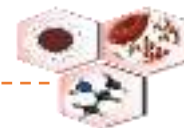
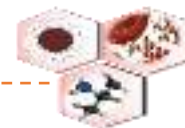


Figura 11. Perfil proteico SDS-PAGE de la CP bajo diferentes condiciones. NPMs modificadas con DMSA y recubiertas con diferentes polímeros de PEG se incubaron con plasma a 10, 20 y 30 minutos respectivamente. Luego del tiempo fijado fueron eluidas secuencialmente con tampones a diferentes valores de pH y fuerza iónica. Las proteínas eluidas fueron aplicadas a una electroforesis SDS-PAGE obteniendo el perfil electroforético a pH 7 “corona de unión débil” (a) y a pH 5 “corona de unión fuerte” (b), respectivamente.

El análisis en el gel de la fracción conocida como “corona de unión débil,” evidenció que la concentración de proteínas se incrementa con el tiempo de incubación (Figura 11a). Este hecho se manifiesta independientemente del tipo de recubrimiento



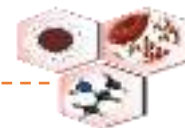
superficial de las partículas. Por otra parte, no se observaron desplazamientos competitivos de las proteínas a los diferentes intervalos de tiempo. Las proteínas detectadas a 10 minutos son también detectadas a 30 minutos con un aumento de su concentración en el medio de elución (Figura 11a).

En el caso de la “corona de unión fuerte”, el análisis del gel evidenció una importante desorción de proteínas a tiempos de 20 y 30 minutos luego de los lavados, en tanto a 10 minutos no se observó prácticamente en el lavado la presencia de proteínas (Figura 11b). El estudio densitométrico de las proteínas unidas a Np-DMSA no evidenció grandes diferencias en la unión de proteínas a tiempos de 20 y 30 minutos. Mientras que en nanopartículas recubiertas con PEG-(NH₂)₂(20 000) puede apreciarse que la adsorción proteica disminuye a 30 minutos respecto a la incubación a 20 minutos. En esta fracción proteica “de unión fuerte”, es posible observar para los tres tipos de recubrimientos de las NPMs, una banda a la altura de los 80kDa, que se asocia por su posición respecto al patrón de peso molecular con la proteína sérica de transporte transferrina.

3.3.2 Determinación de la composición de la CP por LC-MS/MS

Con el objetivo de estudiar la composición de la corona proteica alrededor de los diferentes tipos de nanopartículas se procedió al análisis por LC-MS/MS de las fracciones de proteínas eluidas a pH 5 y pH 7 después de 30 minutos de incubación con plasma. La Tabla 4 (Anexo II) muestra el compendio de todas las proteínas identificadas por espectrometría de masas, representativas de la “corona de unión débil” (pH 7) y “corona de unión fuerte” (pH 5), para las diferentes muestras de Np-DMSA, Np-PEG-(NH₂)₂(2000) y Np-PEG-(NH₂)₂(20 000).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que las NPMs de óxido de hierro, independientemente del recubrimiento (DMSA o polímeros de PEG) interactúan fundamentalmente con inmunoglobulinas, apolipoproteínas, elementos del complemento, albúminas y proteínas de la cascada de coagulación. Este conjunto de proteínas, por demás mayoritarias en plasma, se encuentran distribuidas indistintamente en ambas fracciones (pH 5 y 7) (ver Anexo II). El análisis cuantitativo



y cualitativo de la composición de la corona proteica para las diferentes muestras de NPMs analizadas se muestra en la Figura 12.

Nuestros resultados evidenciaron que, a pesar de que pueden observarse pequeñas diferencias en la cantidad de proteínas totales unidas a las distintas superficies de las NPMs, no existían cambios notables en la composición cualitativa de la CP. Sólo algunas proteínas como el factor de coagulación X, fueron específicamente detectadas en las NPMs recubiertas por los diferentes polímeros de PEG y no así en las Np-DMSA. Alrededor del 70% de las proteínas detectadas a pH 7 (“corona de unión débil”) también pueden detectarse a pH 5 (“corona de unión fuerte”). Por otro lado, el análisis cuantitativo de las proteínas específicas evidenció que en Np-DMSA sólo el 4% de las proteínas se detectan específicamente en la “corona de unión débil” (Figura 12b). Mientras que las nanopartículas recubiertas de polímeros basados en PEG exhiben un porcentaje mayor (11%) (Figura 12c y 12d).



RESULTADOS

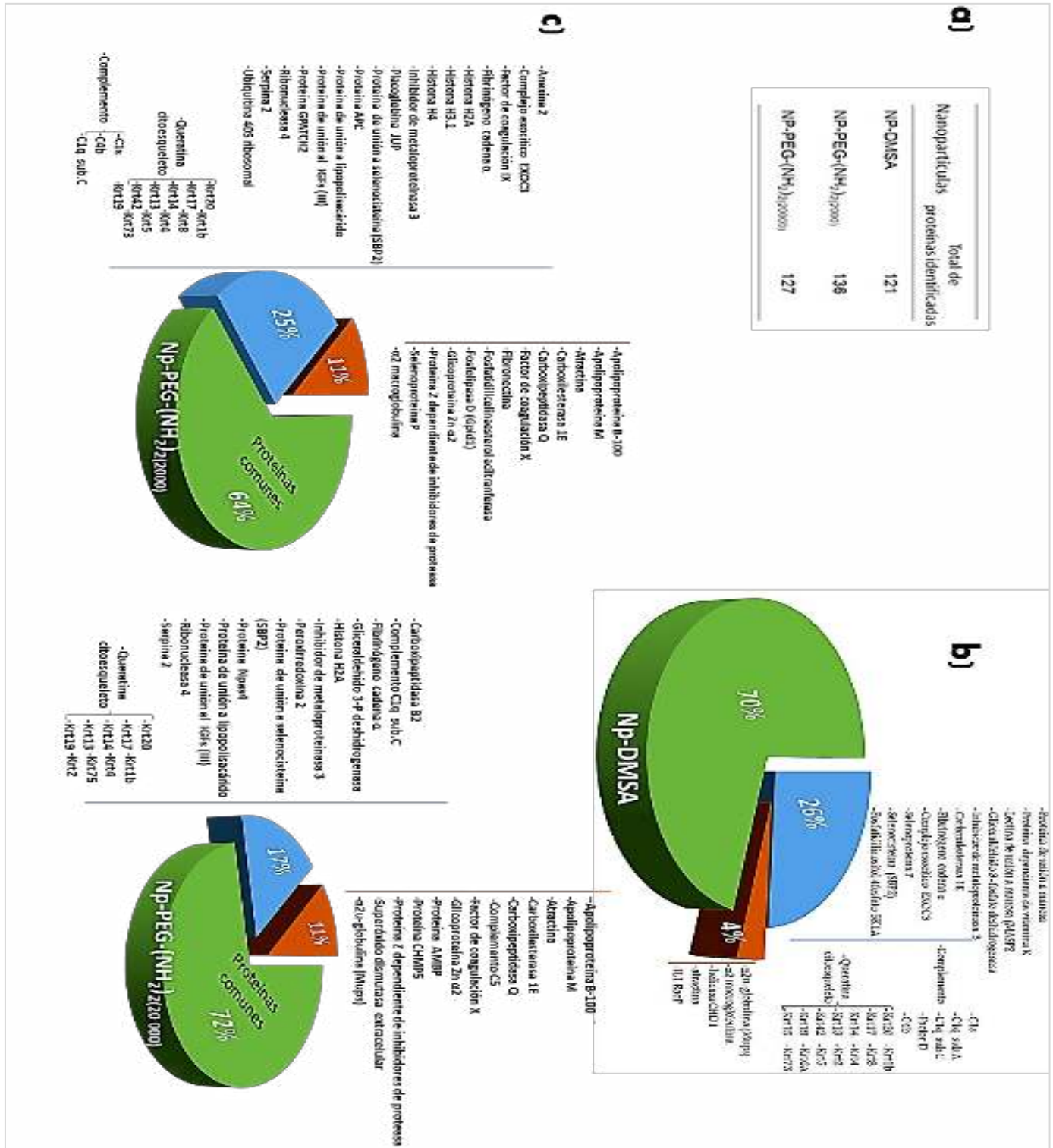
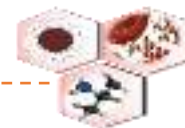


Figura 12. Comparación y caracterización cuantitativa y cualitativa de la CP en NPMs con diferentes recubrimientos. (a) La tabla muestra el número total de proteínas identificadas por MS que interactúan con las NPMs con diferente recubrimiento (b) El gráfico muestra el porcentaje de proteínas comunes (identificadas tanto la fracción “de unión débil” como en la fracción “de unión fuerte”) y las proteínas específicas sólo detectadas en una fracción u otra, así como la relación de dichas proteínas específicas en Np-DMSA, (c) PEG-(NH₂)₂(2000) y (d) PEG-(NH₂)₂(20 000).



3.3.3 Caracterización físico-química de la CP

Con el objetivo de estudiar la naturaleza de la interacción nanopartículas-proteínas, así como la influencia de la química de superficie en la formación de estos complejos, se analizó el perfil de distribución de cargas de las proteínas de la CP, a pH 7 (corona de unión débil) y pH 5 (corona de unión fuerte) en NPMs con diferentes recubrimientos. Para ello se utilizaron los valores teóricos de punto isoeléctrico (pI) de las proteínas identificadas, obtenidos de la base de datos UniprotKb.

La Figura 13 muestra el porcentaje de proteínas aniónicas ($pI > 7.5$), catiónicas ($pI < 6.5$) y neutras ($6.5 < pI < 7.5$) del total de proteínas de las fracciones “de unión fuerte” y “de unión débil” identificadas en diferentes muestras de nanopartículas. Como puede observarse, alrededor del 50% de las proteínas identificadas en ambas fracciones para los tres tipos de recubrimientos analizados (DMSA, PEG-(NH₂)₂₍₂₀₀₀₎, PEG-(NH₂)_{2(20 000)}), se encuentran cargadas positivamente a los valores de pH analizados. Estos resultados son consistentes con el hecho de que las nanopartículas presentan carga superficial neta negativa a estos pH. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mitad de las proteínas identificadas en la superficie de las NPMs presentan carga negativa o neutra; nuestros resultados no evidencian una relación proporcional entre la carga de las NPMs y el perfil de carga teórico de las proteínas, que justifique totalmente la adsorción proteica en términos de interacción electrostática.

El análisis individual de cada una de las fracciones por separado revela que en la corona proteica “de unión débil”, las Np-DMSA presentan mayor porcentaje de adsorción de proteínas cargadas positivamente (58%) respecto a las nanopartículas conjugadas a los PEG de diferente peso molecular. En el caso de la fracción “de unión fuerte” es perceptible en el gráfico un pequeño aumento en los porcentajes de proteínas con carga positiva adsorbidas con respecto a la “corona de unión débil”, en todos los tipos de NPMs.

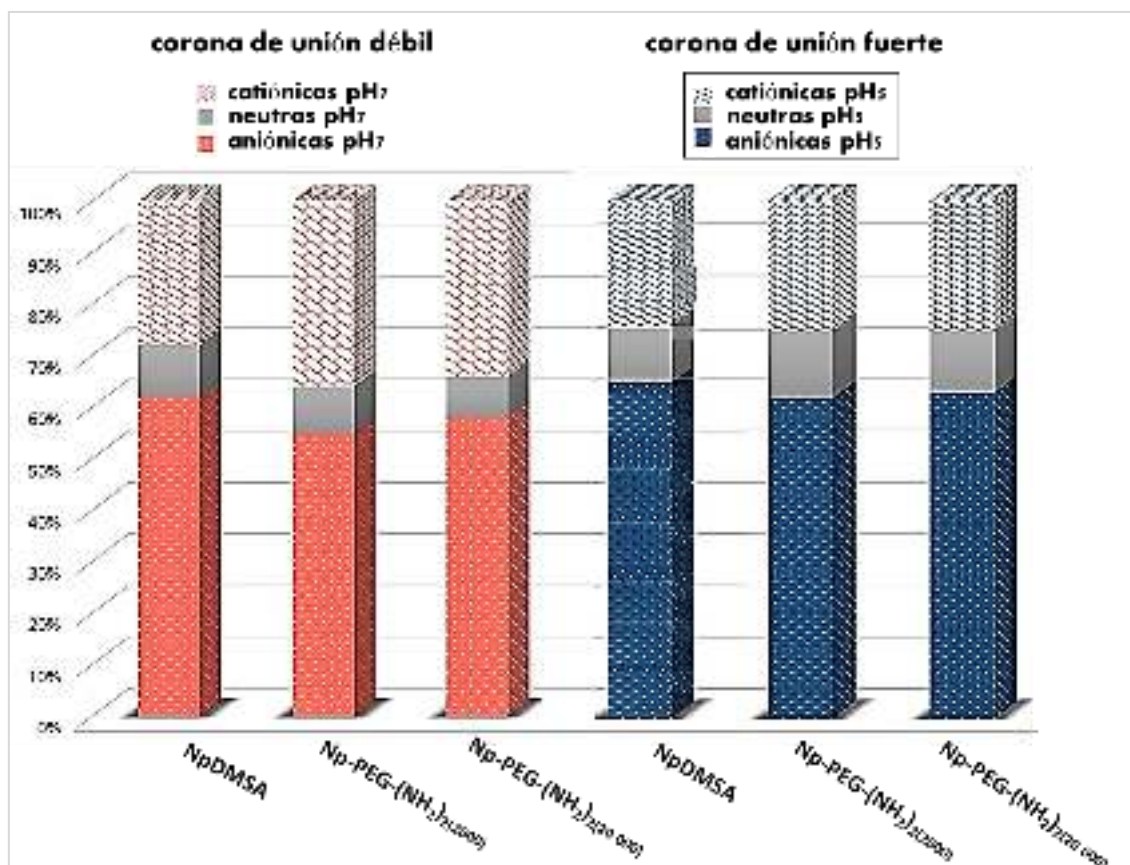
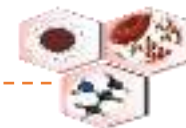
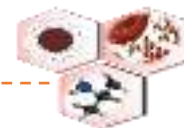


Figura 13. Comparación del perfil de carga de las proteínas individuales detectadas por LC/MS-MS en la superficie de NPMs con diferentes recubrimientos. El punto isoeléctrico teórico de las proteínas identificadas los diferentes pH se obtuvo de la base de datos UniprotKb. Se consideraron cationicas proteínas con $pI < 6.5$, aniónicas $pI > 7.5$ y neutras ($6.5 < pI < 7.5$).

3.3.4 Análisis semicuantitativo de las proteínas séricas en la superficie de las NPMs

En este estudio se realizó además, el análisis semicuantitativo de las principales opsoninas (moléculas coadyuvantes de la fagocitosis) y disopsoninas (proteínas de transporte) identificadas en la “corona de unión fuerte” por el método de conteo espectral (SpC). Para este análisis se escogieron sólo las proteínas identificadas a pH 5 ya que en esta fracción es donde se plantea que se mantienen más estables las interacciones NPMs-proteína y permanecerán unidas más tiempo a la superficie de las nanopartículas, determinando su biodistribución y posterior biotransformación.

El análisis de la abundancia de estas proteínas en las diferentes muestras de NPMs, evidencia que la PEGilación reduce la adsorción de opsoninas con respecto a las



disopsoninas. En tanto en la muestra de Np-DMSA, no se encontraron grandes diferencias en cuanto a la adsorción de opsoninas y dipsoninas (Figura 14).

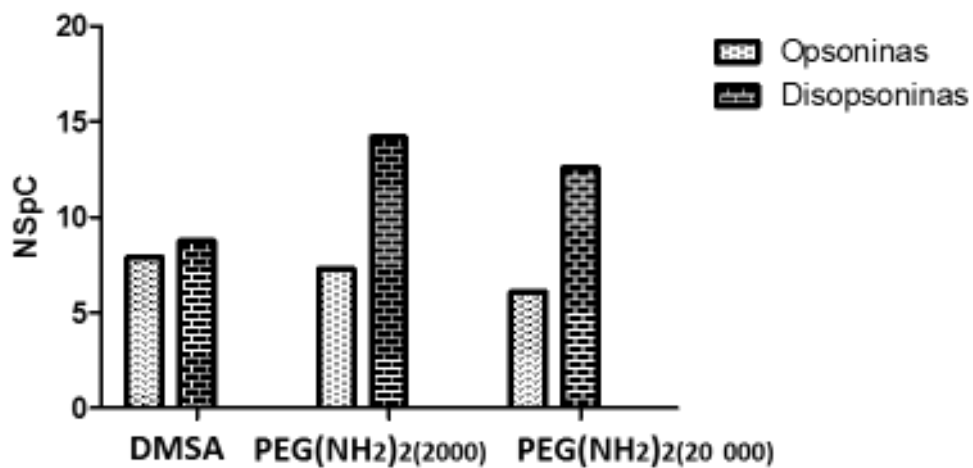
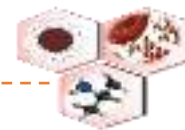


Figura 14. Análisis semicuantitativo por Conteo espectral Normalizado (NSpC) de las principales opsoninas y disopsoninas en la superficie de NPMs con diferentes recubrimientos. El cálculo del NSpC se realizó acorde a la fórmula descrita por (Sakulkhu et al., 2015) (descrito en acápite 2.5.2).

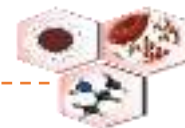


5. DISCUSIÓN

En la actualidad, uno de los mayores desafíos de la industria farmacéutica, consiste en mejorar la acción selectiva de los diversos principios activos utilizados en aplicaciones biomédicas. Razón por la cual, la búsqueda de nuevos enfoques farmacéuticos que contribuyan a la selectividad de estos compuestos, ha cobrado un importante papel en la investigación científica (Blynskaya *et al.*, 2012). Es así como el avance a nivel mundial de la nanotecnología, ha llevado al desarrollo y uso de una gran cantidad de nanomateriales, como las nanopartículas magnéticas, en aplicaciones farmacéuticas y/o médicas (Fischer-Chan, 2007).

Sin embargo, existen determinados factores que condicionan el uso de las NPMs con dichos fines, entre ellos: el tamaño de partícula, las moléculas que recubren su superficie y sus propiedades magnéticas. Otro factor importante a tener en cuenta, es el hecho de que aún sigue sin conocerse a fondo, el impacto que estos nanomateriales pueden tener en la salud. Entre otras razones, debido su compleja interacción con los sistemas vivos, por la gran cantidad de biomoléculas y células con las que pueden establecer una amplia gama de interfaces biológicas (Nel *et al.*, 2009). En este proceso, el recubrimiento superficial es un factor imprescindible a considerar, ya que puede influir tanto en la disposición de las moléculas adsorbidas como en su biodisponibilidad en el organismo (Mahmoudi *et al.*, 2011; Sakulkhu *et al.*, 2015).

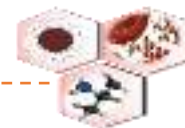
En este trabajo se estudió la influencia de la química superficial de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro en la formación del complejo nanobiomolecular denominado “proteína corona”. Las nanopartículas utilizadas se sintetizaron empleando el método de descomposición térmica en medio orgánico. Dicho método fue elegido porque permite la obtención de NPMs con excelentes propiedades fisicoquímicas si lo que se desea, es una posterior aplicación biomédica (Sun *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2012). Entre dichas propiedades destaca la elevada cristalinidad de las nanopartículas obtenidas y su carácter superparamagnético con un alto valor de magnetización de saturación. A la vez que garantiza el control preciso de la forma y tamaño de las NPMs (≥ 10 nm). Así como una composición homogénea



con una distribución de tamaños estrecha. Entre las limitaciones de esta metodología se encuentra, el fuerte carácter hidrofóbico de las NPMs obtenidas, lo que incompatible para usos *in vivo*.

En este sentido, en nuestro trabajo, fue estudiado un método para obtener suspensiones de partículas estables en agua, basado en una reacción de intercambio de ligandos con DMSA. Esta molécula, permite la estabilización del ferrofluido en medio acuoso, debido a la presencia del grupo -CHSH-COOH en su estructura (Bee *et al.*, 1990; Massart *et al.*, 1995; Fauconnier *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2014). Nuestros resultados evidenciaron que las partículas transferidas a medio acuoso conservan su morfología y propiedades magnéticas, características de gran importancia para potenciales aplicaciones en biomedicina. Sin embargo, la transferencia de las nanopartículas a agua, rompe el autoensamblaje presente en estas cuando estaban recubiertas de ácido oleico. El recubrimiento con una molécula más pequeña como el DMSA, evita que exista el suficiente impedimento estérico para anular la atracción inter-partículas, ya sea por fuerzas de Van der Waals o interacciones magnéticas (Ruiz *et al.*, 2014). Por tanto, las nanopartículas tienden a formar agregados de alrededor de 50-100 nanopartículas, con un tamaño aproximado de 50 nm. Lo cual es consistente con los datos de radio hidrodinámico obtenidos por DLS, aunque es importante destacar que este incremento de tamaño se encuentra dentro del rango reportado en la literatura para su uso biomédico (Arruebo *et al.*, 2007).

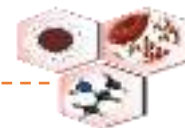
La modificación con DMSA dota a las nanopartículas de una elevada carga negativa superficial (-35mV). Resultado que puede asociarse a los grupos carboxilo (-COO-) libres presentes en la molécula. Aunque no debe ser descartada la influencia de los carboxilo comprometidos en la unión a las nanopartículas. En este sentido se ha descrito que la unión del carboxilato del DMSA a la superficie de las nanopartículas es simétrica, y ocurre a través de sus átomos de oxígeno. Esta unión Fe-C-O muestra un comportamiento similar a un enlace covalente polar. Hecho que podría también contribuir a la alta negatividad superficial de NPMs con este tipo de recubrimiento (Yu-Chowa, 2004). La presencia de DMSA en la superficie de las NPMs posibilita



además la funcionalización con moléculas bioactivas. Así como la unión covalente a diferentes polímeros basados en PEG.

Teniendo en cuenta que la PEGilación de proteínas y superficies constituye una estrategia muy útil para aumentar el tiempo de residencia en sangre de los conjugados y evadir el reconocimiento del sistema inmune (Ruiz *et al.*, 2013a). Las nanopartículas se conjugaron covalentemente a diferentes residuos de PEG diaminados $((\text{NH}_2)_2)$ de 2000 y 20000 Da. Sin embargo la reacción entre los grupos aminos del PEG y carboxilos del DMSA no ocurre de forma espontánea, con lo cual se hace necesario un agente que haga favorable este acoplamiento. El uso de carbodiimidias, especialmente la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es la más utilizada en este tipo de reacciones, puesto que es un método sencillo que permite la funcionalización de las nanopartículas en medio acuoso (Shen *et al.*, 2009). El EDC reacciona con el grupo carboxilo del DMSA formando un grupo oacilisourea y este proceso se conoce como “activación”. Esta estructura sufre una aminólisis por parte de la amina para dar lugar a la amida (Nakajima-Ikada, 1995; Sheehan-Hess, 1995). Este procedimiento ha sido ampliamente descrito en la funcionalización de nanopartículas que se han conjugado a diferentes residuos de PEG (Kohler *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; Hatton, 2007; Sun *et al.*, 2010).

Es conocido como la conjugación de las NPMs a PEG disminuye los grupos carboxilos libres pertenecientes al DMSA que recubría la superficie, por encontrarse comprometidos en el enlace amida con el PEG. Este hecho unido al efecto de apantallamiento de cargas característico de compuestos PEGilados, explica la disminución en la carga superficial de las NPMs observada luego de la reacción de conjugación. La diferencia de carga superficial que se evidencia entre las distintas muestras PEGiladas (-15mV PEG 2000Da; -20mV PEG 20 000Da), demuestra la eficiencia de la reacción de conjugación a cada uno de los residuos de PEG (Figura 8, Capítulo 3). Estos resultados son consistentes con las diferencias en la cantidad de polímero unido en superficie obtenido para ambas muestras (3 moléculas/nm² –PEG 2000Da; 0,5 moléculas/nm² –PEG 20 000Da) mediante el análisis TG. El incremento



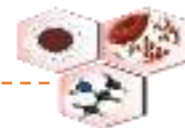
del peso molecular del PEG puede relacionarse con un aumento del impedimento estérico. Lo que confirma el éxito de la conjugación a los diferentes polímeros.

El análisis FTIR confirmó la modificación con DMSA y la eficiente conjugación de los PEG al núcleo metálico de las nanopartículas. En este sentido, el ensanchamiento de las bandas asociadas a la vibración C-O-C en las NPMs conjugadas a PEG-20 000Da, puede asociarse al aumento en la longitud de la cadena y por consiguiente el aumento en la cantidad de subunidades de óxido de etileno. En tanto, los picos correspondientes al enlace amida, no son apreciables en la muestra de nanopartículas conjugadas a este polímero de PEG. Fenómeno que puede estar asociado, al ensanchamiento de las bandas correspondientes a los enlaces C-O-C y -CH. Resultando en el solapamiento de la vibración del enlace amida, debido a la cercanía en el espectro electromagnético. Resultados que evidencian también la eficacia de la conjugación a los diferentes polímeros basados en PEG.

Sin duda, uno de los factores que tienen influencia sobre la farmacocinética de las NPMs además de su tamaño y recubrimiento superficial, es la interacción con biomoléculas (prioritariamente proteínas) de diferentes fluidos biológicos. Estas proteínas recubren las nanopartículas una vez que se ponen en contacto con el ambiente biológico, formando la capa dinámica conocida como “proteína corona”. Donde debe esperarse que según el tamaño, la forma y las características de la superficie las nanopartículas, distintas proteínas tengan diferente afinidad por las NPMs.

En este trabajo se estudió la influencia del recubrimiento superficial de nanopartículas de óxido de hierro en la formación de la CP. De manera que las nanopartículas recubiertas con DMSA y PEG se incubaron con plasma sanguíneo con el objetivo de estudiar la interacción de estos sistemas con las proteínas presentes en dicho fluido.

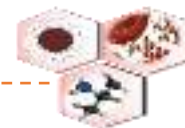
Las diferentes muestras de plasma, provenientes de 10 ratas Wistar, fueron combinadas con el propósito de eliminar la variabilidad del repertorio proteico,



asociado a las condiciones de almacenamiento de las muestras y el acervo genético de cada animal. El método de elección para el primer paso de recuperación de las nanopartículas luego de la incubación con el plasma fue la separación magnética. Aunque existen otros métodos de separación descritos en la literatura para aislar los complejos nanopartícula-proteína, como: la centrifugación, equilibrio de diálisis, cromatografía de exclusión o microfiltración. Cada uno con sus ventajas y limitaciones específicas en lo que se refiere a la reproducibilidad, sensibilidad, y resolución (Tenzer *et al.*, 2011). En este estudio, se escogió la separación magnética por ser uno de los menos agresivos. A diferencia de los otros métodos, la separación magnética no tiene contribución de fuerzas de cizalladura, permitiendo conservar la fracción proteica “de unión débil” (proteínas limitadas por las interacciones débiles) alrededor del nanopartículas. Después de este primer proceso de separación, se escogió para los siguientes pasos de lavado la centrifugación. Éste es un método de separación más fuerte pero fácilmente reproducible.

Nuestros resultados evidencian que en condiciones fisiológicas las NPMs se unen rápidamente a las proteínas séricas, formando un complejo que se mantiene estable hasta los 30 minutos de incubación. Estos resultados sugieren que esta primera interacción es esencial en la formación de la CP, así como en la saturación superficial de las NPMs con proteínas plasmáticas. Es importante destacar que las nanopartículas recubiertas con DMSA muestran mayores valores de D_h , respecto a las conjugadas a los polímeros. Este incremento puede asociarse a la alta negatividad superficial de estas partículas, que contribuye a aumentar la fortaleza de la interacción electrostática con las proteínas unidas. Nuestros resultados evidencian además, que la exposición a un medio rico en sales y proteínas como el plasma, no aumenta el D_h de las nanopartículas por encima de 200nm. Requerimiento de vital importancia si se pretende una aplicación *in vivo* (Arruebo *et al.*, 2007).

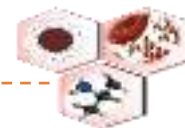
En todas estas estrategias de captura de las proteínas que interactúan con el ligando, una vez purificadas, las proteínas se procesan para su análisis por MS. Frecuentemente este procesamiento incluye la separación de la mezcla de proteínas por SDS-PAGE con el objetivo de reducir la complejidad de la muestra antes del



análisis por MS. Aunque existen otros métodos de fraccionamiento adicionales, ya sea al nivel de proteínas o de péptidos, su utilidad en un contexto específico depende de la complejidad de la muestra y de los objetivos experimentales (Dunham et al., 2011). El análisis del perfil proteico SDS-PAGE obtenido en este trabajo, para las muestras de NPMs analizadas a diferentes tiempos de incubación, evidencian lo anterior (Figura 11, Capítulo 3).

Los resultados del análisis densitométrico de los geles, no revela la existencia de una interacción específica que rija la unión de las proteínas de la fracción denominada “corona de unión débil” a las diferentes superficies de las NPMs. En este estudio se evidencia que estas interacciones débiles suelen estar en mayor proporción y se intercambian rápidamente. Este proceso parece depender fundamentalmente del tiempo de exposición de las nanopartículas al bio-fluido y a la concentración de proteínas mayoritarias.

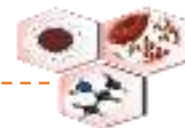
Por otro lado, las proteínas de la fracción “de unión fuerte”, permanecen unidas más tiempo. Esto último puede explicarse teniendo en cuenta que aquellas proteínas que presentan constantes de afinidad mayores, pero que se encuentren en bajas proporciones en plasma, en un primer momento no pueden competir con aquellas mayoritarias, pero debe esperarse que en el tiempo consigan dominar sus interacciones por sobre otras proteínas de mayor expresión plasmática. Cabe destacar que en Np-DMSA la unión proteica superficial de las proteínas de dicha fracción es más fuerte, manteniéndose estable en el tiempo. Mientras que en NPMs conjugadas a PEG a pesar de que se unen más proteínas, la interacción tiende debilitarse con el tiempo, puesto que luego de 30 minutos la proporción de proteínas en nanopartículas PEGiladas disminuye. Este hecho puede ser asociado nuevamente a la fuerte carga superficial negativa de las Np-DMSA. Lo que afirma que el recubrimiento superficial es un factor a considerar, pues según la naturaleza química de las moléculas conjugadas, será la carga superficial final y la disposición que adopten las moléculas adsorbidas a las NPMs.



El análisis del gel SDS-PAGE relevó además, la presencia en ambas fracciones de la corona proteica, de una banda a la altura de los 80kDa, asociada con la proteína sérica transferrina (Tf), que pudo ser luego corroborado en el análisis por MS. Esta molécula tiene una función central en el metabolismo orgánico del hierro debido a que transporta hasta 2 moles de Fe^{3+} por mol de Tf. Estos resultados son consistentes con el hecho de que las NPMs presentan un núcleo de óxido de hierro y corroboran además que dichas nanopartículas pueden ser procesadas desde su entrada al organismo para su incorporación al metabolismo del Fe.

La identificación de las proteínas por espectrometría de masas reveló que las NPMs interactúan con inmunoglobulinas, lipoproteínas, proteínas de fase aguda y proteínas involucradas en la vía del complemento y la coagulación. Resultado esperado teniendo en cuenta el predominio de estas proteínas sobre otros componentes proteicos debido a sus altos niveles en plasma. Las proteínas plasmáticas detectadas en la superficie de las diferentes NPMs se clasificaron en general según su función en: (i) proteínas de transporte, (ii) estructurales, (iii) con función catalizadora, (iv) regulación y señalización y (v) participantes en la respuesta inmune y/o inflamatoria. Es importante mencionar que la identificación (huella dactilar) de las proteínas en la superficie de las NPMs puede variar en un cierto grado en dependencia de la técnica de separación utilizada. Por ejemplo en nuestro trabajo identificamos la presencia de albúmina de suero tanto en la fracción “de unión débil” como “de unión fuerte”. En contraste con otros datos reportados en la literatura (Zhang *et al.*, 2002; Sakulku *et al.*, 2015) donde esta proteína no es reportada en la fracción “fuerte” luego del lavado con tampones de alta fuerza iónica.

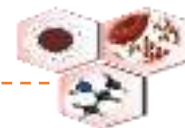
El análisis de las proteínas específicas detectadas en cada fracción de la corona proteica para las diferentes reveló que en la “corona proteica de unión fuerte” de nanopartículas conjugadas a PEG aparecen factores de la coagulación de forma específica que no se detectan en esta misma fracción para Np-DMSA. La absorción específica y diferencial de proteínas en los diferentes tipos de NPMs pudiera explicar determinados fenómenos, como el fuerte carácter anticoagulante que pueden inducir *in vitro* nanopartículas funcionalizadas con DMSA. Es el caso del Factor de coagulación



X que aparece sólo en nanopartículas recubiertas con PEG y no así en las de DMSA. Es conocido que esta proteasa tipo serino dependiente de vitamina K, es la primera que actúa en la vía para la formación de los coágulos (Ali *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015)..

Como parte de este estudio se realizó además, la cuantificación relativa de las principales opsoninas y disopsoninas presentes en la fracción “fuerte” de la corona proteica para las diferentes NPMs estudiadas. Para ello se utilizó el método de conteo espectral (SpC), debido a que la espectrometría de masas no es una técnica cuantitativa en sí misma. Esta metodología permite establecer una relación entre el número de espectros MS/MS identificados de la misma proteína y la masa molecular de dicha proteína. Puesto que un aumento en la abundancia de la proteína, típicamente resulta en un aumento en el número de péptidos proteolíticos que genera, y viceversa. Esta proporción tiene en cuenta el tamaño de la proteína y evalúa la contribución real de cada proteína a la composición de la corona (Monopoli *et al.*, 2011).

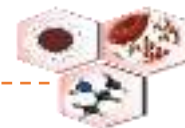
Un fenómeno interesante observado luego de este análisis, es el hecho de que la PEGilación no reduce la adsorción proteica en la superficie de las nanopartículas (Figura 12, Capítulo 3). De manera general se supone que el mecanismo por el cual el PEG extiende el tiempo de circulación de las NPMs y de otras moléculas en general, es porque reduce significativamente la opsonización. Las opsoninas son moléculas coadyuvantes de la fagocitosis, que juegan un importante papel en el “aclaramiento” de antígenos en sangre, como pueden ser las NPMs. Entre ellas se encuentran las inmunoglobulinas IgG e IgA, componentes del sistema del complemento como C3b, C4b o iC3b y la lectina fijadora de manosa. Las disopsoninas por otro lado, como la albúmina de suero y apolipoproteínas, entre otras, son proteínas de transporte que promueven la circulación prolongada de moléculas en la sangre. Consistente con esta noción, numerosos estudios en la literatura científica, han correlacionado la adsorción de proteínas con el reconocimiento de las NPMs por el SFM y receptores del RES, como un indicador importante del aumento de la Opsonización, relacionando la



PEGilación con una disminución en el número de proteínas adsorbidas (Zhang *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007; Verma- Stellacci, 2010). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la PEGilación extiende la vida media de la circulación, pero no reduce la unión a proteínas. De hecho, varios reportes en este sentido, han informado de que la asociación con PEG puede aumentar la adsorción proteica (Verhoef - Anchordoquy, 2013).

Una explicación adicional a la elevada adsorción proteica de nanopartículas PEGiladas, podría estar relacionada a la adsorción de opsoninas en comparación con disopsoninas. Las opsoninas presentes en la corona pueden crear una señal molecular, reconocida por el sistema inmune activando la internalización de partículas, pudiendo así ser claves en su aclaramiento en sangre (Aggarwal *et al.*, 2009). El análisis semicuantitativo de las proteínas de la fracción “de unión débil” reveló, que en NPMs recubiertas con PEG disminuye la unión de opsoninas como fibrinógeno, IgG, factor de complemento, respecto a la adsorción de disopsoninas como la albúmina de suero y apolipoproteínas, etc. que suelen promover el aumento del tiempo de vida media de las nanopartículas en dicho fluido.

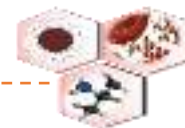
Un análisis más detallado de las proteínas identificadas en NPMs recubiertas con los PEG. Evidencia la unión en la fracción “de unión débil” de determinadas proteínas como la Carboxilesterasa 1E, Proteína S de la coagulación, el Factor D del sistema de complemento y algunas queratinas, no encontradas en dicha fracción de la CP en Np-DMSA. Sin embargo, el análisis de la composición la fracción corona de unión fuerte, evidencia que dichas proteínas están presentes en la superficie de todas las nanopartículas. Este patrón de distribución sugiere la presencia de interacciones débiles y transitorias de estas proteínas con las nanopartículas PEGiladas. En contraste con Np-DMSA, cuya alta electronegatividad superficial explica el aumento de la afinidad electrónica de las proteínas hacia su superficie. Estos resultados sugieren un modelo de adsorción secuencial de proteínas a la superficie de las NPMs. Siendo aquellas proteínas identificadas en la “corona de unión fuerte” las que se unen inicialmente a la superficie sólida por una combinación de interacciones (en su mayoría electrostática y fuerzas hidrofóbicas) más fuertes y estables, seguidas de la



unión de las proteínas de la “corona de unión débil”, con interacciones más débiles y transitorias.

Es posible que la explicación de las propiedades mejoradas de las NPMs inducidas por la conjugación con PEG, en cuanto a la farmacocinética (Ruiz *et al.*, 2013a) pueda estar asociada a las proteínas que se unen específicamente, formando las fracciones “de unión fuerte” y “unión débil” de cada tipo de nanopartícula respetivamente. La unión de proteínas específicas implicadas en el aclaramiento de las NPMs puede ser inhibida preferentemente por PEG. Esta podría ser la razón por la cual sólo podemos detectar la presencia de la proteína C de unión a manosa, implicada en la defensa inmune innata y con ella una mayor captación por los macrófagos en la CP de Np-DMSA y no así en nanopartículas recubiertas a PEG. De esta manera algunas proteínas pueden permanecer asociadas a las NPMs durante el tiempo de vida de la terapia, definiendo así la respuesta biológica e influyendo sobre la captación celular, acumulación en órganos y rutas de aclaramiento (Wattendorf - Merkle, 2008; Dobrovolskaia *et al.*, 2009).

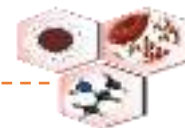
Las proteínas adsorbidas a la superficie de las nanopartículas, como se había comentado anteriormente forma una capa dinámica que potencialmente gobierna la biocinética de los mismas y su destino *in vivo*. Estas interacciones contribuyen al tiempo de duración en la circulación sanguínea, pudiendo tener efectos importantes en la eficacia terapéutica. Por lo cual el análisis de las interacciones que gobiernan esta unión es de vital importancia para mejorar la eficacia de su acción farmacéutica. Nuestros resultados evidencian que el número de proteínas con carga positiva aumenta con la reducción de la carga neta superficial de las nanopartículas (NpDMSA>PEG-(NH₂)₂(2000)>PEG-(NH₂)₂(20 000)). Lo que sugiere que dicho grupo proteico se une rápidamente de manera estable a la superficie de las NPMs, mientras que las otras proteínas con carga negativa o neutra se adsorben más tarde. Sin embargo las evidencias obtenidas en este estudio no revelan una clara relación a nivel electrostático que justifique la elevada adsorción de proteínas aniónicas tales como la albúmina de suero e IgG, por citar algunos ejemplos. Estos resultados muestran que, en conjunto, los efectos electrostáticos no constituyen la principal fuerza que regula



las interacciones proteína-nanopartícula, pero sugieren su influencia en un grupo importante de proteínas.

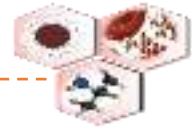
Una posible explicación a este fenómeno pudiera estar relacionado con las características fisicoquímicas de la proteína (tamaño, flexibilidad, y la carga) Estudios bioinformáticos recientes (Benavidez *et al.*, 2015), relacionados con la adsorción proteica a diferentes superficies sólidas clasifican a proteínas tales como la albúmina de suero, mioglobina e IgG como “proteínas blandas” (soft protein). Los autores plantean que este grupo de proteínas (con una entropía conformacional baja) pueden adsorberse a superficies bajo una amplia variedad de condiciones, ya que pueden reordenar su estructura molecular durante el proceso de adsorción. Como consecuencia, en general se acepta que este conjunto proteico puede adsorberse a una variedad de superficies incluso bajo condiciones electrostáticas desfavorables.

De manera general, los resultados de este trabajo evidencian que la adsorción de proteínas a la superficie de las NPMs es un fenómeno que se produce espontáneamente cuando las nanopartículas se ponen en contacto con el biofluido. Nuestro estudio evidencia que el efecto electrostático, aunque influye, no es la única fuerza que puede explicar la adsorción de proteínas en la superficie de las NPMs. Las proteínas que se unen pueden actuar facilitando el reconocimiento de las nanopartículas por células fagocíticas, influyendo así sobre las respuestas inmune e inflamatoria y/o sobre la captura por otros órganos o sistemas como el SFM.



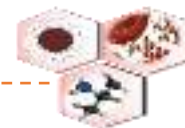
CONCLUSIONES

1. El método de descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro permite la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro con un estricto control del tamaño y excelentes propiedades magnéticas. Hecho que confirma su eficacia como método de síntesis de NPMs para diferentes aplicaciones biotecnológicas y/o médicas.
2. La modificación de las NPMs con DMSA y PEG asegura su estabilización en medio acuoso y provee una cubierta biocompatible, lo que contribuye a mejorar sus propiedades físico-químicas para posteriores usos biomédicos.
3. La formación del complejo proteína corona alrededor de las NPMs es un proceso altamente dinámico, que se manifiesta desde los primeros momentos de contacto del nanomaterial con el fluido biológico, independientemente del recubrimiento superficial. Este fenómeno puede determinar el comportamiento *in vivo* de las nanopartículas dependiendo del tipo y número de proteínas en superficie.
4. La cantidad de proteína adsorbida, la tasa de adsorción y la estabilidad de la corona de proteínas formada alrededor de las nanopartículas depende de las características de la proteína, la superficie del sustrato seleccionado y el microambiente de la interacción. Esto conduce a cambios que pueden permitir una mayor estabilidad, disminuir potenciales efectos citotóxicos y mejorar la biocompatibilización de las NPMs.
5. Las interacciones que median la formación del complejo nanopartículas-proteínas pueden ser claves en la modulación de la biodistribución, eliminación, respuestas inmunes y metabolización de las NPMs, lo que permitiría diseñar nuevas estrategias para mejorar su entrega, así como modular sus posibles efectos en el organismo.



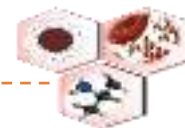
RECOMENDACIONES

1. Caracterizar por espectrometría de masas la evolución de la composición de la CP a diferentes intervalos de tiempo.
2. Estudiar la influencia de polímeros de recubrimiento con carga positiva en la formación de la CP de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro.
3. Caracterizar la CP de Np-DMSA y modificadas con PEG al entrar en contacto con los tejidos donde se acumulan mayoritariamente (hígado, bazo y pulmón).

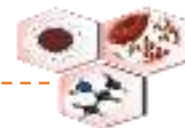


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

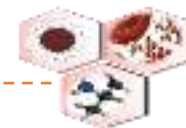
- Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews* 61:428-437.
- Aguiar-Arteaga K, Rodríguez JA, Barrado E. 2010. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* 674:157-165.
- Albanese A, Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. 2014. Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. *ACS Nano* 8:5515-5526.
- Ali LMA, Gutiérrez M, Cornudella R, Moreno JA, Piñol R, Gabilondo L, Millán A, Palacio F. 2013. Hemostasis disorders caused by polymer coated iron oxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9:1272-1285.
- Amici J, Celasco E, Allia P, Tiberto P, Sangermano M. 2011. Poly(ethylene glycol)-coated magnetite nanoparticles: preparation and characterization. *Macromolecular Chemistry and Physics* 212:411-416.
- Amiri H, Wan S, Mahmoudi M, Bordonali L, Lascialfari A, Lynch I, Laurent S, Monopoli MP. 2013. Protein corona affects relaxivity and MRI contrast efficiency of magnetic nanoparticles. *Nanoscale*.
- Amstad E, Gillich T, Bilecka I, Textor M, Reimhult E. 2009. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Letters* 9:4042-4048.
- Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ, Frank JA. 2005. Labeling of cells with ferumoxides–protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed* 18:553–559.
- Arias JL, Reddy LH, Othman M, Gillet B, Desmaele D, Zouhiri F, Dosio F, Gref R, Couvreur P. 2011. Squalene based nanocomposites: A new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano* 5:1513-1521.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra RM, Santamaría J. 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2:22-32.
- Auffan M, Decome L, Rose J, Orsiere T, DeMeo M, Briois V, Chaneac C, Olivi L, Berge-lefranc JL, Botta A, Wiesner MR, Bottero JY. 2006. In vitro Interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environmental Science & Technology* 40:4367-4373.
- Babadi VY, Najafi L, Najafi A, Gholami H, Zarji MEB, Golzadeh J, Amraie E, Shirband A. 2012. Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science* 23.
- Bagaria HG, Ada ET, Shamsuzzoha M, Nikles DE, Johnson DT. 2006. Understanding Mercapto Ligand Exchange on the Surface of FePt Nanoparticles. *Langmuir* 22:7732-7737.
- Barenholz Y. 2012. Doxil-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Control Release* 160:117-134.



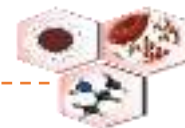
- Barrera C, Herrera AP, Rinaldi C. 2009. Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol). *Journal of colloid and interface science* 329:107-113.
- Bee A, Bouchami T, Brossel R, Cabuil V, Carpentier M, Fruchart JM, Massart R, Neveu S, Pons JN, Robineau M, Roger J. 1990. 9006484. In. France.
- Behzadi S, Serpooshan V, Sakhtianchi R, Müller B, Landfester K, Crespy D, Mahmoudi M. 2014. Protein corona change the drug release profile of nanocarriers: The “overlooked” factor at the nanobio interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123:143-149.
- Benavidez TE, Torrente D, Marucho M, Garcia CD. 2015. Adsorption of Soft and Hard Proteins onto OTCEs under the Influence of an External Electric Field. *Langmuir*.
- Berry CC. 2005. Possible exploitation of magnetic nanoparticle-cell interaction for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry* 15:543–547.
- Blynskaya EV, Alekseev KV, Alyautdin aRN. 2012. Perspectives of the Development of Pharmaceutical Nanotechnology *Russian Journal of General Chemistry* 82:519–526.
- Cole AJ, David AE, Wang J, Galban CJ, Hill HL, Yang VC. 2011. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials* 32:2183-2193.
- Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutierrez L, Morales MP, Bohm IB, Heverhagen JT, Prospero D, Parak WJ. 2012. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society reviews* 41:4306-4334.
- Cui YR, Hong C, Zhou YL, Li Y, Gao XM, Zhang XX. 2011. Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85:1246-1252.
- Chen Y-C, Hsiao J-K, Liu H-M, Lai I-Y, Yao M, Hsu S-C, Ko B-S, Chen Y-C, Yang C-S, Huang D-M. 2010a. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicology and applied pharmacology* 245:272–279.
- Chen YJ, J.Tao, Xiong F, J.B.Zhu, Gu N, Geng KK. 2010b. Characterization and in vitro cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent. *Pharmazie* 65:481-486.
- Chou TC, Hsu W, Wang CH, Chen YJ, Fang JM. 2011. Rapid and specific influenza virus detection by functionalized magnetic nanoparticles and mass spectrometry. *Journal of Nanobiotechnology* 9.
- Chouly C, Bordenave L, Bareille R, Guerin V, Baguey A, Pouliquen D, Baguey C, Jallet P. 1994. In vitro study of the hemocompatibility of superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging. *Clinical Materials* 15:293-301.
- D. Docter, D. Westmeier, M. Markiewicz, S. Stolte, Knauer† SK, Stauber aRH. 2015. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted? *Chemical Society reviews*.
- Dell'Orco D, Lundqvist M, Cedervall T, Linse S. 2012. Delivery success rate of engineered nanoparticles in the presence of the protein corona: a systems-



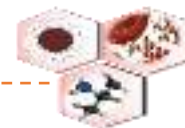
- level screening. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8:1271-1281.
- Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D, Minchin RF. 2009. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20.
- Dobrovolskaia MA, Neun BW, Man S, Ye X, Hansen M, Patri AK, Crist RM, McNeil SE. 2014. Protein corona composition does not accurately predict hematocompatibility of colloidal gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10:1453-1463.
- Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB, McNeil SE. 2009. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 5:106-117.
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, WilliamMacNee, Stone V. 2005. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology* 2.
- Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle J-M. 2006. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 1(2):157–168.
- Dunham W, Larsen B, Tate S, Badillo BG, Goudreault M, Kislinger YT, Gingras aA-C. 2011. A cost–benefit analysis of multidimensional fractionation of affinity purification-mass spectrometry samples. *Proteomics* 11:2603–2612.
- Fang C, Bhattarai N, Sun C, Zhang M. 2009. Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. *Small* 5:1637-1641.
- Fatahian S, Shahbazi-Gahrouei D, Pouladian M, Yousefi MH, Amiri GR, Noori A. 2012. Biodistribution and toxicity assessment of radiolabeled and DMSA coated ferrite nanoparticles in mice. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* 293:915-921.
- Fauconnier N, Pons JN, Roger J, Bee A. 1997. Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *Journal of Colloid Interface Science* 194:427-433.
- Ferrer DL, Bartolomé SM, Villar M, Campillos M, Maroto FM, Vazquez J. 2004. Statistical Model for Large-Scale Peptide Identification in Databases from Tandem Mass Spectra Using SEQUEST. *Anal Chem* 76:6853-6860.
- Fischer-Chan. 2007. Nanotoxicity the growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology* 18:565–571.
- Garcia MP, Parca RM, Chaves SB, Silva LP, Santos AD, Lacava ZGM, Morais PC, Azevedo RB. 2005. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293:277-282.
- Gibbons JP, Monopoli MP, Lundqvist M, Montes-Burgos I, McGrath EE, Elia G, Lynch I, Dawson KA, Stanton KT. 2015. Human plasma protein adsorption onto alumina nanoparticles relevant to orthopedic wear. *J Appl Biomater Funct Mater* 13:e145-e155.
- González I, Arévalo-Serrano J, Pérez JL, Gonzalo P, Gonzalo-Ruiz A. 2008. Effects of b-amyloid peptide on the density of M2 muscarinic acetylcholine



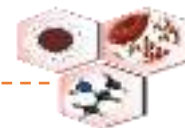
- receptor protein in the hippocampus of the rat: relationship with GABA-, calcium-binding protein and somatostatin-containing cells. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34:506–522.
- Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. 2007. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2:23–39.
- Gupta AK, Wells S. 2004. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE* 3:66-73.
- Gutierrez L, Lazaro FJ, Abadia AR, Romero MS, Quintana C, Morales MP, Patino C, Arranz R. 2006. Bioinorganic transformations of liver iron deposits observed by tissue magnetic characterisation in a rat model. *Journal of inorganic biochemistry* 100:1790-1799.
- Hamm B, Staks T, Taupitz M, Maibauer R, Speidel A, Huppertz A, Frenzel T, Lawaczeck R, Wolf KJ, Lange L. 1994. Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 4:659-668.
- Hatton MLTA. 2007. Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles. *Langmuir* 23:2158-2168.
- Hernando A, Crespo P, García MA. 2005. Metallic Magnetic Nanoparticles. *The Scientific World JOURNAL* 5:972–1001.
- Herranz F, Morales MP, Roca AG, Vilar R, Ruiz-Cabello J. 2008. A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast media & molecular imaging* 3:215-222.
- Huber DL. 2005. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 1:482-501.
- I.Olmedo, E.Araya, F.Sanz, E.Medina, J.Arbiol, P.Toledo, A.Alvarez-Lueje, E.Giralt, M.J.Kogan a. 2008. How Changes in the Sequence of the Peptide CLPFFD-NH₂ Can Modify the Conjugation and Stability of Gold Nanoparticles and Their Affinity for Amyloid Fibrils. *Bioconjugate Chem* 19:1154–1163.
- Jesse V Jokerst, Tatsiana Lobovkina, Richard N Zare, Gambhir SS. 2011. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 6:715-728.
- Jun YW, Huh YM, Choi JS, Lee JH, Song HT, Kim S, Yoon S, Kim KS, Shin JS, Suh JS, Cheon J. 2005. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilisation for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society* 127:5732-5733.
- Kohler N, Fryxell GE, Zhang M. 2004. A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell. *Journal of the American Chemical Society* 126:7206-7211.
- Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, Gunn J, Fang C, Zhang M. 2006. Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* 2:785-792.
- Konczol M, Ebeling S, Goldenberg E, Treude F, Gminski R, Giere R, Grobety B, Rothen-Rutishauser B, Merfort I, Mersch-Sundermann V. 2011. Cytotoxicity



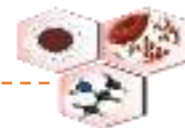
- and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: Role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology* 24:1460-1475.
- Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ, Choi M, Yoon TJ, Han DY, Kang YW, Yoon B-I, Lee JK, Cho MH. 2008. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health* 50(1):1-6.
- Lai Y, Yin W, Liu J, Xi R, Zhan J. 2009. One-pot green synthesis and bioapplication of L-Arginine-capped superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Nanoscale research letters* 5:302-307.
- LaMer VK, Dinegar RH. 1950. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society* 72:4847-4854.
- Latour RA. 2008. Molecular simulation of protein-surface interactions: Benefits, problems, solutions, and future directions. *Biointerphases* 3:FC2-FC12.
- Laurent S, Burtea C, Thirifays C, Hafeli UO, Mahmoudi M. 2012. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and "cell vision". *PloS one* 7:e9997.
- Laurent S, Mahmoudi M. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* 2:367-390.
- Lechuga LM. 2011. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. In: Edikamed SL, editor. *Biotecnología aplicada a la salud humana*. p 98-112.
- Lee CM, Jang D, Kim J, Cheong SJ, Kim EM, Jeong MH, Kim SH, Kim DW, Lim ST, Sohn MH, Jeong YY, Jeong HJ. 2011a. Oleyl-Chitosan Nanoparticles Based on a Dual Probe for Optical/MR Imaging in Vivo. *Bioconjug Chem* 22:186-192.
- Lee DC, Smith DK, Heitsch AT, Korgel BA. 2007. Colloidal magnetic nanocrystals: synthesis, properties and applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)* 103:351-402.
- Lee JH, Choi HK, Lee SY, Lim MW, Chang JH. 2011b. Enhancing immunoassay detection of antigens with multimeric protein Gs. *Biosensors and Bioelectronics* 28:146-151.
- Lee YK, Choi E-J, webster TJ, Kim S-H, Khang D. 2015. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International journal of nanomedicine* 10:97-113.
- Leslie-Pelecky DL, Rieke RD. 1996. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials* 8:1770-1783.
- Li SD, L.Huang a. 2008. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Molecular pharmaceutics* 5:496-504.
- Liu G, Gao J, Ai H, Chen X. 2013. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 9:1533-1545.
- Lu AH, Salabas EL, Schuth F. 2007. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition* 46:1222-1244.



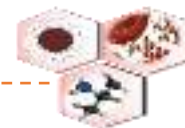
- Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Bergga T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K. 2011. The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *acsnano* 5:7503-7509.
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *PNAS* 105:14265-14270.
- Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. 2007. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in Colloid Interface Science* 134-135:167-174.
- Mahdavi M, Ahmad MB, Haron MJ, Namvar F, Nadi B, Rahman MZA, Amin J. 2013. Synthesis, Surface Modification and Characterisation Molecules 18:7533-7548.
- Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. 2012. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews* 112:2323-2338.
- Mahmoudi M, Shokrgozar MA, Sardari S, Moghadam MK, Vali H, Laurent S, Stroeve P. 2011. Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3:1127-1138.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neurooncology* 103:317-324.
- Makarucha AJ, Todorova N, Yarovsky I. 2011. Nanomaterials in biological environment: a review of computer modelling studies. *Eur Biophys J* 40:103–115.
- Masoudi A, Hosseini HRM, Shokrgozar MA, Ahmadi R, Oghabian MA. 2012. The effect of poly(ethylene glycol) coating on colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *International journal of pharmaceutics* 433:129-141.
- Massart R. 1981. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media *Magnetics, IEEE Transactions* 17:1247-1248.
- Massart R, Roger J, Cabuil V. 1995. New trends in chemistry of magnetic colloids: Polar and non polar magnetic fluids, emulsions, capsules and vesicles *Brazilian Journal of Physics* 25:135-141.
- Mejias R, Perez-Yague S, Gutierrez L, Cabrera LI, Spada R, Acedo P, Serna CJ, Lazaro FJ, Villanueva A, Morales Mdel P, Barber DF. 2011. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 32:2938-2952.
- Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology* 7:779-786.
- Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli F, Dawson KA. 2011. Physical-chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro



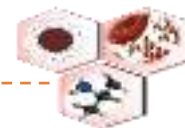
- and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 133:2525-2534.
- Monopoli MP, Wan S, Baldelli-Bombelli F, Mahon E, Dawson KA. 2013. Comparisons of nanoparticle protein corona complexes isolated with different methods. *Nano Life* 3:1343004.
- Nakajima-Ikada. 1995. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate chemistry* 6:123-130.
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* 7:543-557.
- NNI. 2011. The National Nanotechnology Initiative: Research and Development Leading to a Revolution in Technology and Industry. In. Washington, DC, USA: National Science and Technology Council Committee on Technology.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* 113:823–839.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 36:R167–R181.
- Pankhurst QA, Thanh NTK, Jones SK, Dobson J. 2009. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 42:224001.
- Park J, Lee E, Hwang NM, Kang M, Kim SC, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY, Park JH, Hyeon T. 2005. One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* 44:2873-2877.
- Pearson RM, Juettner VV, Hong S. 2014. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Frontiers in Chemistry | Chemical Engineering* 2.
- Piñol R, Brites CDS, Bustamante R, Martínez A, Silva NJO, Murillo JL, Cases R, Carrey J, Estepa C, Sosa C, Palacio F, Carlos LD, Millán A. 2015. Joining Time-Resolved Thermometry and Magnetic-Induced Heating in a Single Nanoparticle Unveils Intriguing Thermal Properties. *ACS Nano* 9:3134–3142.
- Rahman M. 2013. Nanoparticle and Protein Corona. In: *Protein-Nanoparticle Interactions*. Springer Series in Biophysics.
- Rahman M, Ahmad MZ, Kazmi I, Akhter S, Kumar Y, Ahmad FJ, Anwar F. 2012. Novel approach for the treatment of cancer: Theranostic nanomedicine. *Pharmacologia* 3.
- Ramón J, Peniche C, Castro F, Sáez V, Colás R, Páez R. 2009. Un método reproducible para obtener PEG bi-ramificado monofuncional de alta pureza. *Química Nova* 32:1426-1431.
- Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. 2012. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical reviews* 112:5818-5878.
- Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. 2002. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced drug delivery reviews* 54:459.



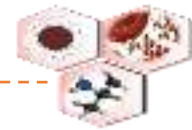
- Robinson DB, Persson HHJ, Zeng H, Li G, Pourmand N, Sun S, Wang SX. 2005. DNA-Functionalized MFe₂O₄ (M = Fe, Co, or Mn) Nanoparticles and Their Hybridization to DNA-Functionalized Surfaces. *Langmuir* 21:3096-3103.
- Roca AG, Costo R, Rebolledo AF, Veintemillas-Verdaguer S, Tartaj P, González-Carreño T, Morales MP, Serna CJ. 2009. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 42:224002.
- Roca AG, Marco JF, Morales MP, Serna CJ. 2007. Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* 111:18577-18584.
- Rosen JE, Chan L, Shieh DB, Gu FX. 2012. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 8:275-290.
- Ruiz A, Ali LMA, Cáceres-Vélez PR, Cornudella R, Gutiérrez M, Moreno JA, Piñol R, Palacio F, Fascineli ML, Azevedo RB, Morales MP, Millán A. 2015. Hematotoxicity of magnetite nanoparticles coated with polyethylene glycol: in vitro and in vivo studies. *Toxicology Research*.
- Ruiz A, Hernández Y, Cabal C, González E, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, Morales MP. 2013a. Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. *Nanoscale* 5:11400-11408.
- Ruiz A, Morais PC, Azevedo RB, Lacava ZGM, Villanueva A, Morales MP. 2014. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. *Journal of Nanoparticle Research* 16.
- Ruiz A, Salas G, Calero M, Hernández Y, Villanueva A, Herranz F, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, Barber DF, Morales MP. 2013b. Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta biomaterialia* 9:6421-6430.
- Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, Coullerez G, Hofmann-Antenbrink M, Vries M, Motazacker M, Rezaee F, Hofmann H. 2015. Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona. *Biomaterials Science* 3:265-278.
- Salas G, Casado C, Teran F, Miranda R, Serna CJ, Morales MP. 2012. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry* 22:21065.
- Salinas B, Ruiz-Cabello J, Morales MP, Herranz F. 2012. Olefin metathesis for the functionalization of superparamagnetic nanoparticles. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* 1:166-172.
- Sheehan-Hess. 1995. A new method of forming peptide bonds. *Journal of American Chemical Society* 77:1067-1068.
- Shen H, Jawaid AM, Snee PT. 2009. Poly(ethylene glycol) carbodiimide coupling reagents for the biological and chemical functionalization of water-soluble nanoparticles. *acsnano* 3:915-923.
- Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews* 61:467-477.



- Singh A, Sahoo SK. 2013. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug Discovery Today*.
- Singh N, Jenkinsa GJS, Asadib R, Doak SH. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* 1.
- Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro J-M, Parak WJ, Smedt SCD, Braeckmans K. 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6:446—465.
- Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in neurobiology* 87:133-170.
- Sun C, Du K, Fang C, Bhattarai N, Veiseh O, Kievit F, Stephen Z, Lee D, Ellenbogen RG, Ratner B, Zhang M. 2010. PEG-mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: Their physicochemical properties and function in vivo. *ACS Nano* 4:2402-2410.
- Sun C, Sze R, Zhang M. 2006. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78:550-557.
- Sun S, Zeng H. 2002. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 124:8204-8205.
- Sun S, Zeng H, Robinson DB, Raoux S, Rice PM, Wang SX, Li G. 2004. Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) Nanoparticles. *Journal of American Chemical Society* 126:273-279.
- Taboada E, Rodríguez E, Roig A, Oró J, A. Roch, Muller RN. 2007. Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. *Langmuir* 23, (8):4583-4588.
- Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekik A, Knauer SK, Bantz C, Nawroth T, Bier C, Sirirattanapan J, Mann W, Treuel L, Zellner R, Maskos M, Schild H, Stauber RH. 2011. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* 5:7155-7167.
- Verhoef JF, Anchordoquy TJ. 2013. Questioning the use of PEGylation for drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* 3:499-503.
- Verma A, Stellacci F. 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6:12-21.
- Villanueva A, Canete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, Morales MP, Miranda R. 2009. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 20:115103.
- Walkey CD, Chan aWCW. 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 41:2780—2799.
- Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen W, Cohen Y, Emili A, Chan WCW. 2014. Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cell Association of Gold Nanoparticles. *ACS Nano*.
- Wan S, Kelly PM, Mahon E, Stöckmann H, Caruso F, Dawson KA, Yan Y, Monopoli MP. 2015. The “sweet” side of the protein corona: effects of glycosylation on nanoparticle-cell interactions. *ACS Nano*.



- Wang C, Ravi S, Martinez GV, Chinnasamy V, Raulji P, Howell M, Davis Y, Mallela J, Seehra MS, Mohapatra S. 2012. Dual-purpose magnetic micelles for MRI and gene delivery. *Journal of Controlled Release* 163: 82–92.
- Wang R, Billone PS, Mullett WM. 2013. Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials* 2013:629681.
- Wang YX. 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery* 1:35-40.
- Wattendorf U, Merkle HP. 2008. PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 97:4655-4669.
- Webster R, Elliott V, Park BK, Walker D, Hankin M, Taupin P. 2009. PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In: Veronese FM, editor. *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*: Birkhäuser Basel. p 127-146.
- Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 175:489-493.
- Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J. 1989. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology* 152:167-173.
- Wessel-Fluegge. 1984. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry* 138:141-143.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology* 3:487-497.
- Xie J, Xu C, Kohler N, Hou Y, Sun S. 2007. Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Advanced Materials* 19:3163-3166.
- Yu-Chowa. 2004. Carboxyl group (–CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications. *Journal of Materials Chemistry* 14:2781 –2782 2786.
- Yu M, Huang S, Yu KJ, Clyne AM. 2012. Dextran and Polymer Polyethylene Glycol (PEG) Coating Reduce Both 5 and 30 nm Iron Oxide Nanoparticle Cytotoxicity in 2D and 3D Cell Culture. *Int J Mol Sci* 13:5554-5570.
- Zhang L, He R, Gu H-C. 2006. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* 253:2611–2617.
- Zhang Y, Kohler N, Zhang M. 2002. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 23:1553–1561.



ANEXOS

ANEXO I: Perfil electroforético SDS-PAGE de la CP aislada a pH 4.

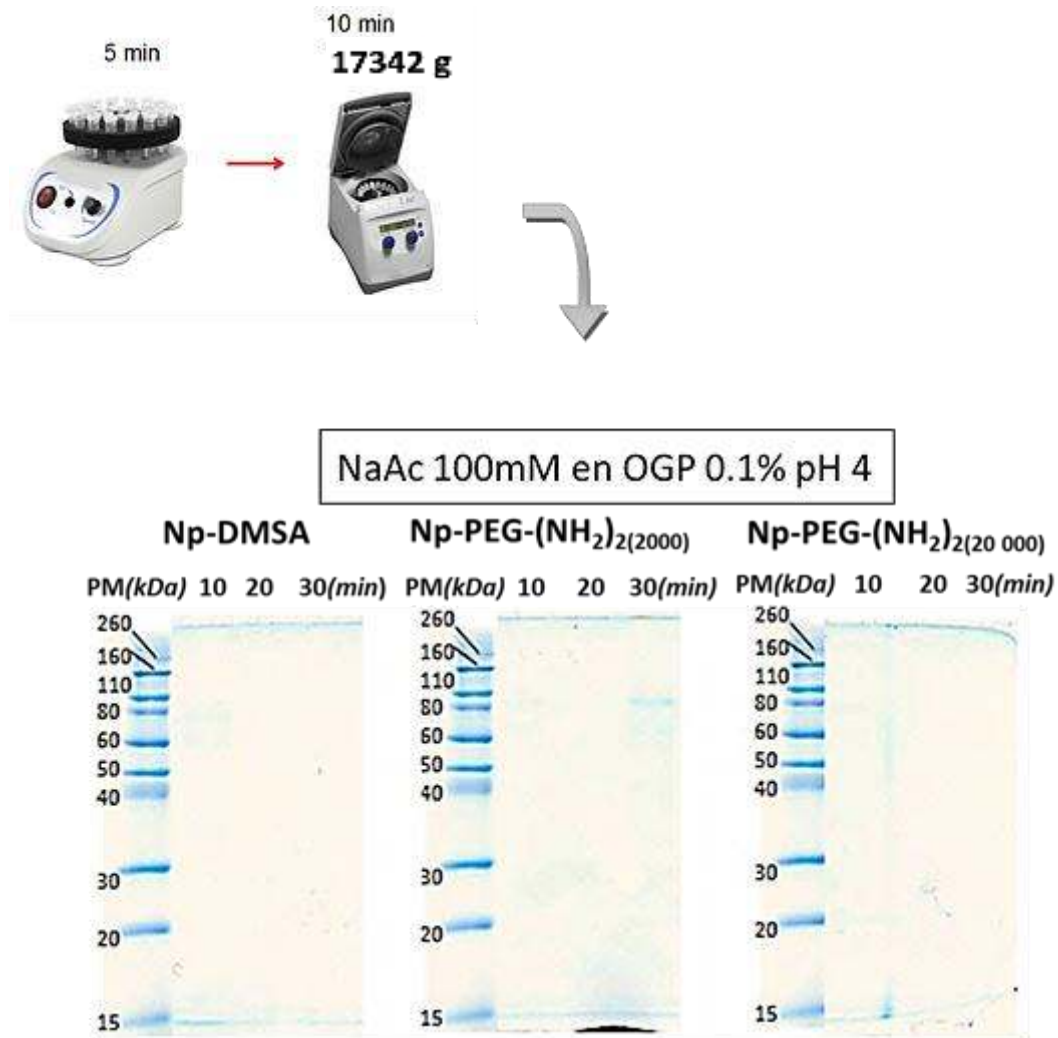


Figura I. NPMs modificadas con DMSA y recubiertas con diferentes polímeros de PEG se incubaron con plasma a 10, 20 y 30 minutos respectivamente. Luego del tiempo fijado fueron eluidas secuencialmente con un tampón a pH 4. Las proteínas eluidas fueron aplicadas a una electroforesis SDS-PAGE obteniendo el perfil electroforético.



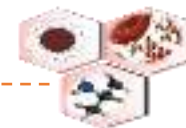
ANEXO II: Proteínas individuales identificadas por espectrometría de masas agrupadas acorde a su estructura y/o función molecular

Proteínas	Masa Molecular (Da)	NP-DMSA		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (20 000)	
		pH 7	pH5	pH 7	pH5	pH 7	pH5
Inmunoglobulinas							
Ig cadena k región C, alelo B	11732	x	x	x	x	x	x
Ig cadena k región C, alelo A	11863	x	x	x	x	x	x
Ig cadena λ-2 región C	11449	x	x	x	x	x	x
Ig cadena γ-1 región C	36383	x	x	x	x	x	x
Ig cadena γ-2B región C	36980	x	x	x	x	x	x
Ig cadena γ-2C región C	36962	x	x	x	x	x	x
Ig cadena pesada V región IR2	16152	-	-	x	x	-	-
Ig cadena γ-2A región C	35577	x	x	x	x	x	x
Lipoproteínas							
Apolipoproteína A-IV	44429	x	x	x	x	x	x
Apolipoproteína E	35777	x	x	x	x	x	x
Clusterina	51848	x	x	x	x	x	x
Apolipoproteína A-I	30089	x	x	x	x	x	x
Apolipoproteína A-II	11478	x	x	x	x	x	x
Apolipoproteína M	21774	x	x	x	-	x	-
Apolipoproteína B-100	537343	x	x	x	-	x	-
Apolipoproteína C-I	9854	x	x	x	x	x	x
Apolipoproteína C-IV	14752						
Sistema de complemento							
Complemento C1s	78263	-	x	-	x	x	x
Complemento C9	63252	x	x	x	x	x	x
Complemento C3	187538	x	x	x	x	x	x
Complemento C6	108034	x	x	x	x	x	x
Complemento C4	193330	x	x	x	x	x	x
Complemento C8-β	68049	x	x	x	x	x	x
Complemento factor D	28838	-	x	x	x	x	x
Complemento factor I	69093	x	x	x	x	x	x
Proteína reactiva C	25682	x	x	x	x	x	x
Complemento C1q subunidad A	26131	-	-	x	x	x	x
Complemento C1q subunidad B	26757	x	x	-	-	-	-
Complemento C1q subunidad C	25900	-	x	-	x	-	x
Complemento C5 (Fragmento)	9251	-	-	-	-	-	x
Proteína C de unión a manosa	26320	-	x	-	-	-	-
Cadena β proteína de unión a C4b	29359	-	x	-	x	-	-
Proteasa plasmática inhibidora de C1	55760	x	x	x	x	x	x
Transporte							
Albúmina de suero	70296	x	x	x	x	x	x
Serotransferrina	78093	x	x	x	x	x	x
Hemopexina	51916	x	x	x	x	x	x
Ceruloplasmina	121408	x	x	x	x	x	x
Haptoglobina	38952	x	x	x	x	x	x
Hemoglobina subunidad α-1/2	15457	x	x	x	x	x	x
Hemoglobina subunidad β-1	16061	x	x	x	x	x	x
Hemoglobina subunidad β-2	16064	x	x	x	x	x	x
Proteína cargada de cuerpos multivesiculares 5	24606	-	-	-	-	x	-
Complejo exocítico- EXOC3	86993	-	x	-	x	-	-
Globulina de unión a corticosteroides	44780	x	x	x	x	x	x



Proteínas individuales identificadas por espectrometría de masas agrupadas acorde a su estructura y/o función molecular (Continuación de la anterior)

Proteínas	Masa Molecular (Da)	NP-DMSA	NP-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)	NP-PEG-(NH ₂) ₂ (20 000)
pH7				
Cascada de Coagulación				
Plasminógeno	92684	x	x	x
Factor de coagulación X	55334	x		x
Proteína S dependiente de Vitamina K	76234	-	x	x
Angiotensinógeno	52133	x	x	x
Fibrinógeno cadena α	87230	-	x	-
Factor de coagulación IX	31750	x	x	-
T-kininógeno 2	48547	x	x	x
T- kininógeno 1	48618	x	x	x
Protrombina	71516	x	x	x
Kininógeno-1	71763	x	x	x
Heparina cofactor 2	54701	x	x	x
Factor de coagulación XII	67640	x	x	x
Glicoproteína rica en Histidina	59793	x	x	x
α -2 macroglobulina	164831	x	x	-
Factor plaquetario 4	11463	x	x	x
Componentes estructurales				
Keratina tipo I de citoesqueleto 10	56654	x	x	x
Keratina tipo I de citoesqueleto 13	48021	-	x	-
Keratina tipo I de citoesqueleto 14	52881	-	x	-
Keratina tipo I de citoesqueleto 15	48978	-	x	x
Keratina tipo I de citoesqueleto 17	48323	-	x	-
Keratina tipo I de citoesqueleto 19	44609	-	x	-
Keratina tipo I de citoesqueleto 20	49403	-	x	-
Keratina tipo I de citoesqueleto 42	50458	-	x	-
Keratina tipo II de citoesqueleto 1	65113	x	x	x
Keratina tipo II de citoesqueleto 1b	57358	-	x	-
Keratina tipo II de citoesqueleto 4	57907	-	x	-
Keratina tipo II de citoesqueleto 5	61926	-	x	x
Keratina tipo II de citoesqueleto 8	53985	-	x	-
Keratina tipo II de citoesqueleto 2	69407	-	x	x
Keratina tipo II de citoesqueleto 6A	59489	-	x	x
Keratina tipo II de citoesqueleto 72	57276	x	-	-
Keratina tipo II de citoesqueleto 73	60855	-	x	x
Keratina tipo II de citoesqueleto 75	59175	-	x	-
Actina citoplasmática 1	41986	x	x	x
Placoglobina JUP	82347	-	-	x
Fibroconectina	275284	x	x	-
Gelsolina	86336	x	x	x
Histona H2A tipo 1-C	14097	-	-	x
Histona H3.1	15486	-	-	x
Histona H4	11360	-	-	x
Proteína 6 de unión al cromodominio ADN helicasa	305558	-	-	x
Proteína del dominio GPATCH 4	46320	-	-	x
Proteína del dominio PAS neuronal 4	87861	-	-	x
Proteína de unión a SecIS 2	93978	-	x	-
Receptores				
Receptor del factor inhibidor de leucemia	123375	-	-	x
Proteína accesoria del receptor de IL-1	66200	x	-	-



Proteínas individuales identificadas por espectrometría de masas agrupadas acorde a su estructura y/o función molecular (Continuación de la anterior)

Proteínas	Masa Molecular (Da)	NP-DMSA		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (20 000)	
		pH 7	pH5	pH 7	pH5	pH 7	pH5
Enzimas e Inhibidores							
Carboxilesterasa 1C	60412	X	X	X	X	X	X
Carboxilesterasa 1E	61905	-	X	X	-	X	-
Carboxipeptidasa Q	52055	-	-	X	-	X	-
Carboxipeptidasa B2	49117	X	X	X	X	-	X
Glutación peroxidasa 3	25593	X	X	X	X	X	X
Ribonucleasa 4	17260	-	-	-	X	-	X
Cadena catalítica N Carboxipeptidasa	52178	X	X	X	X	-	-
Inhibidor serino-proteasa A3K	46716	X	X	X	X	X	X
Inhibidor serino-proteasa A3L	46386	X	X	X	X	X	X
Inhibidor serino-proteasa A3N	46760	X	X	X	X	X	X
Inhibidor serino proteasa A3M	46158	X	X	X	X	X	X
Calicreína plasmática	72929	X	X	X	X	X	X
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa	36035	-	X	X	X	-	X
Inhibidor de metaloproteína 3	24808	-	X	-	X	-	X
Serpina 2	44173	-	-	-	X	-	X
Lectina fijadora de manosa (MASP2)	76814	-	X	-	-	-	-
Paraoxonasa de suero/Arilesterasa 1	39517	X	X	X	X	X	X
Peroxirredoxina 2	21908	-	-	-	-	-	X
Fosfatidilinositol 4P 5 quinasa 1α	60843	-	X	-	-	-	-
Proteína Z dependiente de inhibidores de proteasa	50304	X	X	X	-	X	-
Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn]	26925	X	X	X	-	X	X
Fosfatidil-colina-esterol aciltransferasa	49971	-	-	X	-	-	-
Fosfolipasa D (Gpld1)	94182	X	X	X	-	X	X
Inhibidor de tripsina inter-α-H3	99312	X	X	X	X	X	X
α-1-antiproteína/antitripsina	46244	X	X	X	X	X	X
α-1-inhibidor 3	164773	X	X	X	X	X	X
Otras funciones							
Atractina	162661	X	-	X	-	X	-
Fetuaína-B	42226	X	X	X	X	X	X
Afamina	70808	X	X	X	X	X	X
Proteína AMBP	39562	X	X	X	X	X	-
α-1 macroglobulina	168123	X	X	X	X	X	X
Murinoglobulina-1	166325	X	X	X	X	X	X
Murinoglobulina-2	162591	X	X	X	X	X	X
β-2 microglobulina	13803	X	X	X	X	X	X
Transtirretina	15802	X	X	X	X	X	X
Glicoproteína Zn-α2	34180	X	X	X	-	X	-
Glicoproteína α2-HS	38602	X	X	X	X	X	X
Glicoproteína α1-B	56994	X	X	X	X	X	X
Glicoproteína ácida α1	23698	X	X	X	X	X	X



Proteínas individuales identificadas por espectrometría de masas agrupadas acorde a su estructura y/o función molecular (Continuación de la anterior)

Proteínas	Masa Molecular (Da)	NP-DMSA		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)		NP-PEG-(NH ₂) ₂ (2000)	
		pH 7	pH5	pH 7	pH5	pH 7	pH5
<i>Otras funciones (Cont.)</i>							
Proteína de unión al retinol 4	23481	X	X	X	X	X	X
Proteína de unión a vitamina D	54797	X	X	X	X	X	X
Proteína de matriz extracelular 1	64542	X	X	X	X	X	X
Componente P del suero amiloide	26251	X	X	X	X	X	X
α ₂ μ-globulina (Mups)	20953	X	-	X	X	X	-
β-2-glycoproteína 1	34095	X	X	X	X	X	X
Proteína de unión a LPS	53704	-	-	-	X	-	X
Proteína de unión al IGFs (III)	32487	X	X	X	X	X	X
Subunidad del complejo ácido de la proteína de unión al IGFs	67413	X	X	X	X	X	X