

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

NANOBIOCONJUGADOS CON BASE EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE Y/O FULLERENOL, BUFORINA II Y LA PROTEÍNA *OmpA*, CON POTENCIAL USO COMO VEHÍCULOS DE PENETRACIÓN CELULAR

Eduardo Ravelo Nieto

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2022

NANOBIOCONJUGADOS CON BASE EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE Y/O FULLERENOL, BUFORINA II Y LA PROTEÍNA *OmpA*, CON POTENCIAL USO COMO VEHÍCULOS DE PENETRACIÓN CELULAR

Eduardo Ravelo Nieto

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Química

Director:

PhD. Juan Carlos Cruz Jiménez

Codirector:

Dr. rer. nat. Alvaro Duarte Ruiz

Línea de Investigación:

Bionanotecnología y Biomateriales

Grupo de Investigación:

Nuevos Materiales Nano y Supramoleculares - Universidad Nacional de Colombia

Departamento de Ingeniería Biomédica - Universidad de los Andes

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022

Dedicado

A Dios y a toda mi familia, pilares que sustentan mi vida.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

EDUARDO RAVELO NIETO

Fecha 05/05/2022

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Universidad de Los Andes por todo el proceso de formación.

Al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Los Andes por todo el apoyo técnico, además de facilitar laboratorios e infraestructura para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Especialmente a los profesores Juan Carlos Cruz Jiménez y Álvaro Duarte Ruiz por la dirección de este trabajo de tesis y todo lo que ello implicó.

A los profesores Luis H. Reyes, Eliseo Avella Moreno, John William Sandino Del Busto, y Ruth Lancheros por los diferentes apoyos y asesorías.

A Javier Cifuentes, Paola Ruiz, Laura Rueda, Carlos A. Martínez, Cristina González, Tatiana Beltrán, Julián Serna, Valentina Quezada, Mónica Gantiva y Eliana Benincore por todo el apoyo científico en el diseño y desarrollo de los diferentes experimentos.

A todos los compañeros del Grupo de Investigación en Nuevos Materiales Nano y Supramoleculares de la Universidad Nacional de Colombia y de los Departamentos de Ingeniería Biomédica y de Ingeniería Química y de Alimentos de la Universidad de Los Andes.

A mis padres, a mis hermanos, a la señora Nelly, a todos mis amigos y a mi esposa por todo el apoyo recibido durante todo este tiempo.

Resumen

NANOBIOCONJUGADOS CON BASE EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE Y/O FULLERENOL, BUFORINA II Y LA PROTEÍNA *OmpA*, CON POTENCIAL USO COMO VEHÍCULOS DE PENETRACIÓN CELULAR

Diferentes barreras biológicas son generalmente responsables de la limitada liberación de cargos a nivel celular, como estrategia terapéutica. Previamente, se desarrolló una nueva familia de nanobioconjugados con capacidad de penetración celular y de escape a la ruta endosomal, inmovilizando el péptido Buforina II (BUF-II) y la proteína *OmpA* en nanopartículas (NPs) de magnetita. Aquí, proponemos ampliar este enfoque a nanopartículas de sílice (SNPs) y fullerénol (F) como soportes nanoestructurados para la conjugación de estos potentes agentes de penetración celular, ya que la misma molécula conjugada a diferentes nanotransportadores puede exhibir diferentes interacciones con compartimentos subcelulares. Los nanobioconjugados obtenidos (*OmpA*-SNPs, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, *OmpA*-F y BUF-II-PEG₁₂-F) se caracterizaron mediante técnicas como espectroscopia infrarroja (FT-IR), UV-vis, Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Movilidad Electroforética, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Análisis termogravimétrico (TGA), Difracción de Rayos X (DRX), y Microscopía confocal para evaluar composición, tamaño, carga, morfología, y confirmar la conjugación de dichos agentes translocantes. Los nanobioconjugados mostraron alta capacidad de internalización en células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202), sin afectar la viabilidad celular, no mostraron efecto hemolítico significativo, así como baja tendencia a inducir agregación plaquetaria. Adicionalmente, mostraron diferente comportamiento en el tráfico intracelular y escape endosomal en estas dos líneas celulares, lo que una vez más demostró el potencial de estos materiales para abordar los desafíos de liberación citoplasmática de fármacos o el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal.

Palabras clave: nanobioconjugado, Buforina II, OmpA, nanopartículas de sílice, fullerol, internalización celular, escape endosomal.

Abstract

NANOBIOCONJUGATES BASED ON SILICA NANOPARTICLES AND/OR FULLEROL, BUFORIN II AND THE *OmpA* PROTEIN, WITH POTENTIAL USE AS CELL PENETRATION VEHICLES

Several biological barriers are generally responsible for the limited delivery of cargoes at the cellular level, as a therapeutic strategy. Previously, a new family of nanobioconjugates capable of cell penetration and endosomal escape was developed by immobilizing the Buforin II (BUF-II) peptide and the OmpA protein on magnetite nanoparticles (NPs). Here, we propose to extend this approach to silica NPs (SNPs) and fullerol (F) as nanostructured supports for the conjugation of these potent cell-penetrating agents, as the same molecule conjugated to different nanocarriers may exhibit different interactions with subcellular compartments. The obtained nanobioconjugates (OmpA-SNPs, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, OmpA-F, and BUF-II-PEG₁₂-F) were characterized via Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), UV-vis, Dynamic Light Scattering (DLS), Electrophoretic Mobility, Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD) techniques, and confocal microscopy was conducted to evaluate size, charge, composition, morphology, and to confirm the conjugation of these translocating agents on the NPs. Nanobioconjugates showed high internalization capacity in Vero cells (ATCC® CCL-81) and THP-1 cells (ATCC® TIB-202), without affecting cell viability, showed no significant hemolytic effect, as well as low propensity to induce platelet aggregation. Additionally, nanobioconjugates showed different intracellular trafficking and endosomal escape behavior in these two cell lines, showing once again the potential of these materials to address the challenges of cytoplasmic drugs delivery or the development of therapeutics for the treatment of lysosomal storage diseases.

Keywords: nanobioconjugates, Buforin II, OmpA, silica nanoparticles, fullerol, cellular uptake, endosomal escape.

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico	19
1.1 Referente conceptual.....	19
1.1.1 Nanopartículas	19
1.1.2 Propiedades de las NPs.....	19
1.1.3 Funcionalización de las NPs.....	20
1.1.4 Interacciones entre las NPs y la membrana celular	21
1.1.6 Mecanismos de escape endosomal	25
1.1.7 Bioconjugación.....	26
1.1.8 Buforinas.....	27
1.1.9 OmpA.....	28
2. Estado del arte	29
3. Problema de investigación.....	34
4. Objetivos	36
4.1. Objetivo general	36
4.2. Objetivos específicos.....	36
5. Materiales y métodos.....	38
5.1 Materiales	38
5.2 Equipos empleados para la caracterización de los materiales sintetizados.....	39
5.3 Obtención de los nanobioconjugados con base en SNPs	40
5.3.1 Síntesis y silanización de las SNPs.....	40
5.3.2 Bioconjugación de Buforina II en las SNPs silanizadas	41
5.3.3 Bioconjugación de OmpA en SNPs silanizadas.....	43
5.4 Obtención de los nanobioconjugados con base en fullerenol.....	44
5.4.1 Síntesis de fullerenol	44
5.4.2 Silanización del fullerenol	46
5.4.3 Bioconjugación de Buforina II en las NPs de fullerenol silanizadas	46
5.4.4 Bioconjugación de OmpA en las NPs de fullerenol silanizadas	48
5.5 Ensayos biológicos	48
5.5.1 Detección de contaminación bacteriana de los nanobioconjugados en placas de agar	48
5.5.2 Biocompatibilidad	49
Análisis <i>in vitro</i> de las propiedades hemolíticas de los nanobioconjugados	49

Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de los nanobioconjugados en la agregación plaquetaria	50
Ensayo MTT para monitorear la viabilidad celular	50
5.5.3 Liberación de los nanobioconjugados en células de mamíferos.....	51
5.5.4 Ensayo de actividad antibacteriana.....	52
5.5.5 Análisis estadístico	52
6. Resultados y discusión	53
6.1 Caracterización fisicoquímica de los nanobioconjugados basados en SNPs....	53
6.2 Ensayos biológicos de los nanobioconjugados basados en SNPs	60
6.2.1 Detección de contaminación bacteriana en los nanobioconjugados basados en SNPs mediante placas de agar	60
6.2.2 Biocompatibilidad de los nanobioconjugados basados en SNPs	61
6.2.3 Actividad antimicrobiana de los nanobioconjugados basados en SNPs.....	62
6.2.4 Translocación y escape endosomal de los nanobioconjugados basados en SNPs	63
6.3 Síntesis de fullerenol	67
6.4 Caracterización fisicoquímica de los nanobioconjugados basados en fullerenol	69
6.5 Ensayos biológicos de los nanobioconjugados basados en fullerenol	76
6.5.1 Detección de contaminación bacteriana en los nanobioconjugados basados en fullerenol mediante placas de agar	76
6.5.2 Biocompatibilidad de los nanobioconjugados basados en fullerenol	77
6.5.3 Translocación y escape endosomal de los nanobioconjugados basados en fullerenol	78
7. Conclusiones y Recomendaciones.....	82

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Ilustración del aumento del área superficial por la disminución del tamaño de partícula ³⁸	20
Figura 1-2. Estructura general de un agente de acoplamiento silano ⁴¹	21
Figura 1-3. Esquema de las rutas de endocitosis y exocitosis de nanopartículas ¹²	24
Figura 1-4. Mecanismos de escape endosomal. a) Efecto esponja de protones. b) Fusión de membrana. c) Formación de poros mediados por péptidos. d) Rompimiento de membrana mediado por polímeros ¹²	25
Figura 1-5. Representación de la estructura de la BUF-II en medio hidrofóbico; la BUF-II es derivado de la BUF-I aislado inicialmente del sapo <i>Bufo gargarizans</i> , de donde deriva su nombre.....	28
Figura 1-6. Representación de la estructura de la proteína OmpA de <i>E. coli</i> (cepa K12) (UniProtKB - P0DJO6 (OMPA_SHIBL)).	28
Figura 2-1. Algunos sistemas de liberación de cargos basados en fullerenos ²¹	30
Figura 2-2. Diferentes métodos para la obtención de fullerenos ⁶⁵	31
Figura 2-3. Resumen de algunos nanotransportadores que se han explorado para la administración de material terapéutico, junto con ilustraciones de sus propiedades fisicoquímicas ⁸¹	33
Figura 5-1. Representación esquemática de la obtención de SNPs y SNPs silanizadas ⁸⁶	40
Figura 5-2. Representación esquemática del protocolo seguido para la obtención de los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs ⁴⁴	42
Figura 5-3. Representación esquemática del protocolo seguido para la obtención de los nanobioconjugados SNPs-OmpA ^{89,90}	44
Figura 5-4. Procedimiento de síntesis y purificación del fullereno.....	45
Figura 5-5. Proceso de silanización del fullereno.....	46
Figura 5-6. Representación esquemática del protocolo seguido para la bioconjugación de BUF-II con el fullereno silanizado ⁴⁴	47
Figura 5-7. Representación esquemática del protocolo seguido para la bioconjugación de OmpA con el fullereno silanizado ^{89,90}	48
Figura 6-1. Esquema de la estructura química de las SNPs silanizadas y los bionanoconjugados.....	53
Figura 6-2. Espectro UV-vis de las SNPs desnudas y de las SNPs silanizadas ⁹⁸	54
Figura 6-3. Difractogramas de rayos X de las SNPs y SNPs silanizadas.	54

Figura 6-4. Espectros FTIR de (1) SNPs desnudas, (2) SNPs silanizadas, (3) BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs, (4) BUF-II libre.....	55
Figura 6-5. Espectros FTIR de (1) SNPs desnudas, (2) SNPs silanizadas, (3) OmpA-SNPs, (4) OmpA libre.	56
Figura 6-6. Distribución de tamaño por intensidad de las SNPs desnudas, SNPs silanizadas y los nanobioconjugados determinados por DLS.	57
Figura 6-7. Termogramas de las SNPs, SNPs silanizadas y los nanobioconjugados. ...	58
Figura 6-8. Micrografías electrónicas de barrido y transmisión de las SNPs silanizadas, Nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs y Nanobioconjugados OMPA-SNPs.....	59
Figura 6-9. Detección de contaminación bacteriana mediante placas de agar.....	61
Figura 6-10. a) Evaluación de la citotoxicidad de los nanobioconjugados mediante ensayos de MTT después de 24 y 48 horas de exposición a los tratamientos. b) Evaluación <i>in vitro</i> de la hemocompatibilidad. Evaluación del efecto hemolítico de los nanobioconjugados (Control positivo: Tritón X-100, control negativo: PBS; y evaluación <i>in vitro</i> de agregación plaquetaria (Control positivo: Trombina, control negativo: PBS).	62
Figura 6-11. Actividad antibacteriana de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs y OmpA-SNPs contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	63
Figura 6-12. Imágenes de microscopía confocal de células Vero (ATCC® CCL-81), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs y OmpA-SNPs durante 30 minutos y 4 horas.	64
Figura 6-13. Imágenes de microscopía confocal de células THP-1 (ATCC® TIB-202), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs y OmpA-SNPs durante 30 minutos y 4 horas.	65
Figura 6-14. CCP para la colocalización de los nanobioconjugados y organelos ácidos (lisosomas/endosomas). b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados distribuidas en el espacio intracelular, tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas.....	66
Figura 6-15. a) CCP para la colocalización de BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs, OmpA-SNPs y organelos ácidos (lisosomas/endosomas) tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas. b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -SNPs y OmpA-SNPs distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas.	67
Figura 6-16. Síntesis de fullereno reacción mediante reacción de un solo paso a partir de fullereno C ₆₀ por hidroxilación con H ₂ O ₂ en presencia de TBAH, en condiciones de bicapa orgánica/acuosa ⁶⁴	68
Figura 6-17. Posible mecanismo de reacción para la formación de fullerenos ⁶⁴	69
Figura 6-18. Espectro UV-vis de fullereno C ₆₀ en tolueno y solución acuosa del fullereno sintetizado.	69
Figura 6-19. Espectros FTIR de (1) fullereno C ₆₀ , (2) fullereno sin purificar (con TBAH residual) (3) fullereno purificado por cromatografía de columna, (4) fullereno purificado por diálisis.	70
Figura 6-20. Espectros FTIR de (1) fullereno, (2) fullereno silanizado.....	70

Figura 6-21. Espectros FTIR de (1) <i>OmpA</i> libre, (2) fullereno silanizado, (3) <i>OmpA</i> -fullereno.	71
Figura 6-22. Espectros FTIR de (1) BUF-II libre, (2) fullereno silanizado, (3) BUFII-PEG ₁₂ -fullereno.	72
Figura 6-23. Distribución de tamaño por intensidad del fullereno y los nanobioconjugados basados en fullereno, determinados por DLS.	73
Figura 6-24. Termogramas del fullereno purificado, fullereno silanizado, y los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F, y <i>OmpA</i> -fullereno.	74
Figura 6-25. Micrografías electrónicas de transmisión de: a) fullereno b) Nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F c) Nanobioconjugados OMPA-fullereno.	75
Figura 6-26. Detección de contaminación bacteriana mediante placas de agar.	76
Figura 6-27. a) Evaluación de la citotoxicidad de los nanobioconjugados basados en fullereno mediante ensayos de MTT después de 24 y 48 horas. b) Evaluación <i>in vitro</i> de la hemocompatibilidad. Evaluación del efecto hemolítico de los nanobioconjugados basados en fullereno (Control positivo: Tritón X-100, control negativo: PBS; y evaluación de la agregación plaquetaria <i>in vitro</i> (Control positivo: Trombina, control negativo: PBS).	77
Figura 6-28. Imágenes de microscopía confocal de células Vero (ATCC® CCL-81), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F y <i>OmpA</i> -F durante 30 minutos y 4 horas.	78
Figura 6-29. Imágenes de microscopía confocal de células THP-1 (ATCC® TIB-202), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F y <i>OmpA</i> -F durante 30 minutos y 4 horas.	79
Figura 6-30. a) CCP para la colocalización de los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F, <i>OmpA</i> -F y compartimientos intracelulares con valores de pH ácidos (lisosomas/endosomas) tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas. b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F, <i>OmpA</i> -F distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas.	80
Figura 6-31. a) CCP para la colocalización de los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F, <i>OmpA</i> -F y compartimientos intracelulares de pH ácidos (lisosomas/endosomas). b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG ₁₂ -F, <i>OmpA</i> -F distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas.	81

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Comparación de la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la histona H2A de <i>Xenopus</i> con Buforina I y Buforina II.....	27
Tabla 6-1. Descripción de varios modos vibracionales de amidas en péptidos y proteínas	55

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
<i>as</i>	Asimétrica (vibración)
<i>ib</i>	flexión en el plano (<i>in-plane bending</i>)
<i>d</i>	Vibración de deformación
<i>s</i>	Vibración de tensión
<i>sy</i>	<i>Symmetric</i> (vibración simétrica)

Abreviaturas

Abrev	Término
<i>APTES</i>	(3-aminopropil)trietóxisilano
<i>BUF-II</i>	<i>Buforina II</i> .
<i>CPP</i>	<i>Cell-penetrating peptides</i> (péptidos penetrantes de células)
<i>DLS</i>	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dispersión dinámica de luz)
<i>DOSY</i>	<i>Diffusion ordered spectroscopy</i> (<i>Espectroscopia de difusión ordenada</i>)
<i>DSC</i>	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (<i>Calorimetría de barrido diferencial</i>)
<i>et al.</i> ,	<i>Et alii</i> (y otros)
<i>e.g.</i> ,	<i>Exempli gratia</i> (dado como ejemplo)
<i>EDC</i>	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, clorhidrato
<i>FDA</i>	<i>United States Food and Drug Administration</i> (<i>Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos</i>)
<i>FT-IR</i>	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (<i>Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier</i>)
<i>NPs</i>	Nanopartículas
<i>OmpA</i>	<i>Outer membrane protein A</i> (Membrana de proteína externa A)
<i>PEG</i>	<i>Polietilenglicol</i>
<i>SEM</i>	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (<i>Microscopia electrónica de barrido</i>)
<i>SNPs</i>	Nanopartículas de sílice
<i>TBAH</i>	Hidróxido de Tetra-n-butilamonio
<i>TEOS</i>	Tetraetilo ortosilicato
<i>TEM</i>	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (<i>Microscopia electrónica de transmisión</i>)
<i>TGA</i>	<i>Thermogravimetric analysis</i> (<i>Análisis termogravimétrico</i>)

Introducción

Debido a los diferentes problemas presentados en la administración de fármacos convencionales, relacionados con su eficacia y seguridad, uno de los principales retos de la investigación en esta área es la administración de material terapéutico (fármacos, proteínas o ácidos nucleicos) de manera controlada y localizada dentro de la célula o tejido deseado. Por su potencial capacidad de superar dichas limitaciones, los sistemas basados en nanotecnología han atraído una atención cada vez mayor ¹. En este sentido, la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en la medicina ha llevado al desarrollo y uso de nanotransportadores capaces de liberar material para diagnóstico o moléculas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades ². Los nanotransportadores basados en NPs son adecuados para alcanzar el nivel celular y subcelular, ya que este es el rango de tamaño de componentes celulares importantes como la membrana celular (espesor de 1-4 nm), el ADN (el ADN de doble hebra tiene ~2.5 nm de diámetro), un sinnúmero de proteínas (e.g., hemoglobina tiene ~5 nm de diámetro), y los compartimientos subcelulares ³. Además, las propiedades de las NPs cambian con respecto a los materiales macroscópicos, porque a medida que las partículas reducen su tamaño, aumenta la fracción de átomos ubicados en su superficie, así como su área superficial ⁴. Esto conlleva a una mayor reactividad y diferentes propiedades fisicoquímicas ⁴.

Los nanotransportadores se diseñan para mejorar las propiedades terapéuticas y farmacológicas de los fármacos convencionales y reducir los efectos adversos, para ello deben superar diferentes barreras biológicas y eludir los mecanismos de defensa del cuerpo ⁵⁻⁷. Algunas de estas barreras incluyen el sistema vascular y algunos componentes de la circulación sanguínea como metabolitos empleados como nutrientes, proteínas, azúcares, y otras sustancias se adsorben espontáneamente en los nanotransportadores, formando una “corona de proteínas” que pueden eventualmente provocar una respuesta inmune o enmascarar las funcionalidades químicas o biológicas incorporadas en los nanotransportadores ^{8,9}. Además, existe la barrera impuesta por la membrana celular, la cual cumple funciones estructurales y regula el intercambio de sustancias entre el medio

interno y externo de la célula ¹⁰. Cuando los nanotransportadores son muy grandes para cruzar la membrana celular por difusión o alcanzar el espacio intracelular a través de proteínas membranales de transporte, las células envuelven estas partículas exógenas en su propia membrana celular, dando así lugar a la formación de endosomas que atrapan el material ingerido y lo mantienen aislado ^{11,12}. Como resultado, otro reto que enfrentan estos nanotransportadores es la necesidad de escapar la formación de estos endosomas, o de lo contrario, debido a los mecanismos de control de tráfico intracelular, terminan atrapados en lisosomas, lugar donde se verán expuestos a una gran variedad de enzimas especializadas en degradación ¹². Esto generalmente lleva a que los cargos transportados pierdan su funcionalidad biológica. Por otra parte, el hecho de que materiales nanoestructurados se acumulen en los lisosomas, podría servir para explorar tratamientos de enfermedades de depósito lisosomal ^{13,14}.

Una estrategia atractiva para abordar estos desafíos es considerar que diferentes propiedades de las NPs (*e.g.*, composición, tamaño, forma, carga superficial, funcionalidad de la superficie) se pueden ajustar para controlar el transporte a nivel celular de diferentes cargos (*e.g.*, fármacos, proteínas, enzimas, diferentes tipos de secuencias de nucleótidos para terapias génicas). Adicionalmente, estos factores juegan un rol clave en la interacción con las células y en los mecanismos de escape endosomal ^{11,15,16}.

El uso de SNPs en aplicaciones biomédicas inició con la publicación de Stöber *et al.*, en 1968, quienes establecieron una ruta para sintetizar SNPs sólidas, esféricas y de tamaños entre 5 y 2000 nm, usando el proceso de sol-gel en medio alcalino. El método consiste en hidrólisis y policondensación de tetraetilo ortosilicato (TEOS) en mezclas de amoníaco en solución, alcohol y agua ¹⁷. Entre las ventajas de las SNPs están que son “generalmente reconocidas como seguras” por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), pueden ser sintetizadas en varios tamaños y su superficie puede ser fácilmente modificada ^{18,19}. A diferencia de las NPs poliméricas, las SNPs presentan una mayor densidad, lo que permite que puedan ser lavadas mediante microcentrifugación en caso de que se empleen excesos de reactivos para su modificación. Además, no se encogen ni se hinchan cuando se exponen a ambientes acuosos o no acuosos. Sin embargo, una desventaja importante de las SNPs es la tendencia de los enlaces de siloxano entre los átomos de silicio dentro de las SNPs a sufrir hidrólisis ²⁰.

Por otra parte, una clase emergente de nanomateriales a base de carbono para la entrega dirigida de cargos a nivel celular son los fullerenos. Estos materiales exhiben una estructura con propiedades fisicoquímicas únicas y una jaula altamente simétrica con diferentes tamaños (C_{60} , C_{76} , etc.). El fullereno C_{60} es el que presenta mayor simetría, se compone de 60 átomos de carbono con enlaces simples C5-C5 (12 pentágonos) y enlaces dobles C5=C6 (20 hexágonos). Posee una estructura esférica única y un fuerte carácter apolar. Justamente, una limitación para explotar esta molécula en aplicaciones biológicas es su insolubilidad en agua, el medio natural de este tipo de sistemas. Adicionalmente, su baja solubilidad en muchos solventes orgánicos limita las posibilidades para llevar a cabo modificaciones superficiales en esquemas de síntesis sencillos y escalables ²¹.

En cuanto a la caracterización de NPs para aplicaciones biomédicas, una primera etapa implica su caracterización fisicoquímica, para obtener información sobre composición, pureza, estabilidad, etc. Estas propiedades influyen directamente en el comportamiento biológico ya que este puede depender de parámetros como su tamaño y distribución de tamaño de las partículas, su carga superficial, su funcionalidad superficial, su morfología y el estado de agregación. En etapas posteriores se requieren ensayos *in vitro* y evaluación *in vivo* ⁵.

Adicionalmente, la modificación de superficies de los nanotransportadores con funcionalidades químicas es una ruta para la ingeniería de interacciones específicas con los constituyentes de las barreras biológicas para penetrarlas y eventualmente atravesarlas ^{12,16,21,22}. Entre muchas otras, algunas de las moléculas para la funcionalización incluyen polímeros naturales y sintéticos, proteínas y péptidos translocantes, fosfolípidos y polisacáridos ^{16,23,24}. Dependiendo de los parámetros fisicoquímicos de los nanotransportadores, las interacciones con tales moléculas pueden variar significativamente y alterar su funcionalidad ^{16,25,26}. Como resultado, la misma molécula conjugada a diferentes nanotransportadores puede exhibir diferentes interacciones con compartimentos subcelulares ²⁷. Durante los últimos años, en el Departamento de Ingeniería Biomédica de La Universidad de Los Andes se desarrolló una nueva familia de nanobioconjugados con capacidad de penetración celular y escape endosomal al inmovilizar el péptido antimicrobiano BUF-II y la proteína surfactante OmpA en NPs de magnetita ²⁸⁻³⁰. De igual forma, el grupo de Investigación en Nuevos Materiales

18 Nanobioconjugados con base en nanopartículas de sílice y/o fullereno, Buforina II y la proteína *OmpA*, con potencial uso como vehículos de penetración celular

Nano y Supramoleculares de la Universidad Nacional de Colombia tiene amplia experiencia en la síntesis de nanomateriales y derivados de fullerenos³¹⁻³⁷. De aquí, que en este proyecto de investigación combinamos experiencias para explorar el impacto de cambiar el soporte nanoestructurado en la capacidad de translocación y en su capacidad de escape endosomal. En consecuencia, se propone que las SNPs y el fullereno pueden proporcionar un soporte nanoestructurado diferente para la conjugación de estos potentes agentes de penetración celular. En este sentido, estamos interesados en establecer si los nuevos nanobioconjugados cuentan con la capacidad de penetración celular y escape endosomal, ya que de ello depende el éxito de un sinnúmero de terapias farmacológicas.

1. Marco teórico

1.1 Referente conceptual

1.1.1 Nanopartículas

La definición de NPs difiere según los materiales y las aplicaciones de estas. En el sentido estricto, se consideran partículas menores de 10-20 nm, donde las propiedades físicas de los materiales sólidos cambian drásticamente. Sin embargo, partículas con dimensiones en el intervalo de 1 nm a 1 μm también podrían llamarse NPs ³⁸. Los tipos de NPs usados en aplicaciones biológicas son muy variados, mayormente se usan NPs no porosas y con forma esférica. Sin embargo, también han sido ensayadas NPs amorfas y agregadas, otras de formas geométricas elaboradas como varillas, tubos, cubos, triángulos y conos. También han sido utilizados materiales orgánicos en el rango de los nanómetros que incluyen fullerenos, nanotubos de carbono y dendrímeros, que son estructuras altamente definidas que han sido usadas como andamios para la bioconjugación en diversas aplicaciones. La composición química de las NPs es igualmente variada; entre las NPs comerciales se encuentran polímeros y copolímeros, NPs inorgánicas, metales semiconductores, compuestos superparamagnéticos, dendrímeros, entre otras ²⁰.

1.1.2 Propiedades de las NPs

Las propiedades de las NPs son muy distintas a las que se observan en un sólido de tamaño macroscópico con la misma composición química ³⁹. Como se muestra en la **Figura 1-1**, si un cubo con longitud lateral de 1 cm se divide en cubos de 1 μm , el número de piezas aumenta a 10^{12} , y si se divide en cubos de 10 nm, asciende a 10^{18} , de la misma forma su área superficial, por lo tanto, la fracción de átomos en la superficie las hacen más

activas para la interacción con otros materiales y provoca diferentes cambios en sus propiedades ³⁸.

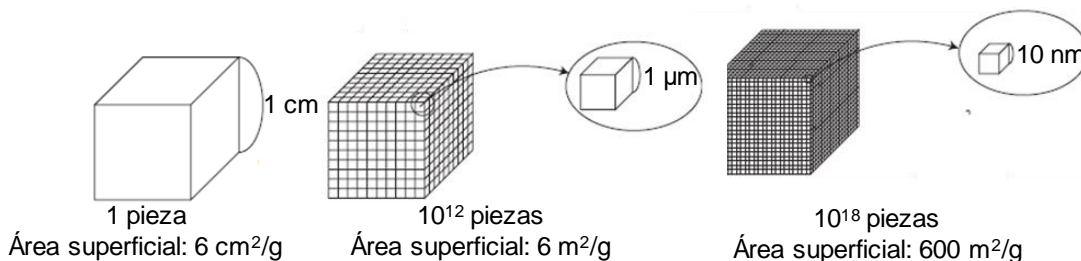


Figura 1-1. Ilustración del aumento del área superficial por la disminución del tamaño de partícula ³⁸.

Entre las propiedades únicas de las NPs se destacan (1) las propiedades morfológicas/estructurales: en los óxidos metálicos existe la evidencia del aumento del espaciado interatómico con la disminución del tamaño. (2) Las propiedades térmicas: el punto de fusión de algunas NPs, e.g., NPs de oro, disminuye rápidamente para tamaños menores de 10 nm. (3) Las propiedades mecánicas, que por lo general extienden el límite resistencia-ductilidad fuera de los límites de los materiales convencionales. (4) Las propiedades magnéticas: los materiales ferromagnéticos usualmente forman dominios magnéticos múltiples, en cambio, las NPs magnéticas frecuentemente consisten en un solo dominio, que conduce a que presenten supermagnetismo. (5) Las propiedades ópticas: principalmente se presentan variaciones en el color en función de la forma y el tamaño de las NPs y (6) las propiedades químicas: las NPs tienen una muy alta relación entre el área superficial y el volumen, lo que influye en la reactividad química ⁴⁰.

1.1.3 Funcionalización de las NPs

La funcionalización de las NPs consiste en la modificación química de su superficie. En las SNPs y los fullerenos se aprovecha la reactividad de los grupos hidroxilo en la superficie, para llevar a cabo la condensación de agentes de acoplamiento silano, mediante un proceso denominado silanización. Un agente de acoplamiento silano incluye un grupo reactivo al final de una cadena alquílica, ésta unida a un átomo central de silicio, que también tiene unidos hasta tres grupos hidrolizables (**Figura 1-2**) ⁴¹.

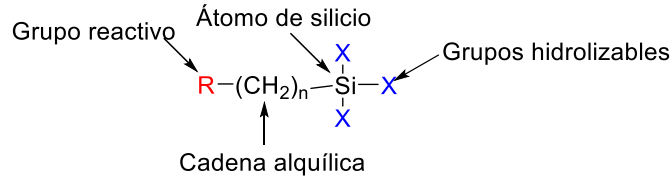


Figura 1-2. Estructura general de un agente de acoplamiento silano ⁴¹.

La silanización ayuda a mejorar la estabilidad de las NPs y puede usarse para formar enlaces covalentes con otras moléculas o superficies ⁴². El agente de acoplamiento silano mayormente utilizado es el 3-aminopropil)trietóxisilano (APTES). Éste da lugar a la formación de un recubrimiento covalente que contiene grupos amina primaria disponibles para la conjugación posterior a las biomoléculas de interés ⁴¹. Adicionalmente, los grupos amino de las proteínas pueden reaccionar con el glutaraldehído (bis-aldehído) para formar derivados activados capaces de formar conjugados con otras moléculas ⁴³. Por otra parte, el EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, clorhidrato) es la carbodiimida más utilizada para conjugar sustancias biológicas que contienen carboxilatos y aminas. Se aplica comúnmente en la conjugación de partículas y superficies junto con la NHS (N-hidroxisuccinimida), ya que esta molécula ayuda a extender la estabilidad del EDC ⁴⁴.

1.1.4 Interacciones entre las NPs y la membrana celular

Mecanismos de internalización

La membrana celular es una capa delgada (4-10 nm), conformada principalmente por lípidos y proteínas, cuyo ensamble forman una barrera selectiva, que tiene como función regular la composición del medio intracelular, controlando el flujo de sustancias hacia dentro y fuera de la célula, además de proporcionar soporte estructural ⁴⁵.

Los mecanismos de transporte utilizados por las células se pueden agrupar en tres clases: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo. La *difusión simple* es un proceso pasivo mediante el cual las sustancias se mueven a través de la membrana impulsadas por un gradiente de concentración o potencial eléctrico, sin necesidad de intermediarios y sin que haya un aporte externo de energía. La *difusión facilitada* también es un movimiento pasivo, pero se produce con la ayuda de proteínas de membrana. Por otra parte, el *transporte activo* requiere energía de la célula para el movimiento de sustancias a través de la membrana celular contra un gradiente de concentración u otro factor obstructivo ¹¹.

Cuando las moléculas o partículas son muy grandes para cruzar la membrana celular o para moverse a través de proteínas de transporte, las células capturan estas sustancias desde su exterior envolviéndolas con su propia membrana celular, formando una vesícula que contiene el material ingerido; a este proceso se le llama endocitosis, un término amplio usado para diferentes vías específicas con mecanismos individuales, clasificados dependiendo del tipo de célula, así como de proteínas, lípidos y otras moléculas involucradas (**Figura 1-3**)¹². La endocitosis se puede subdividir en fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis es el proceso por el cual las células, principalmente fagocitos especializados (e.g., macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas) pero también otros tipos de células (e.g., fibroblastos, células epiteliales y endoteliales), internalizan partículas de más de 0.5 μm y las digieren. Por otra parte, la pinocitosis es un proceso común en muchos tipos de células y está involucrada en la internalización de cargos mediante pequeñas vesículas^{12,16}. La pinocitosis se puede dividir en varias categorías como son, la macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y la endocitosis independiente de clatrina y caveolina¹¹.

La *macropinocitosis* es un proceso de endocitosis inducible y transitorio, dependiente de actina, que lleva a la internalización de fluidos o partículas por protrusión de la membrana generando grandes vesículas (0.2-5 μm) denominadas macropinosomas^{11,16}.

La *endocitosis dependiente de clatrina* es una vía endocítica por el cual las células obtienen nutrientes y componentes de la membrana plasmática. La *endocitosis dependiente de clatrina* tiene lugar a través de receptores específicos que poseen señales de internalización o por captación adsorbente no específica o independiente de receptor. La clatrina es una proteína que junto con otras es responsable del ensamble de una arquitectura compleja que genera y estabiliza una curvatura en la membrana plasmática que se invagina y se desprende de la membrana, generando una vesícula pequeña (100-150 nm de diámetro) recubierta por clatrina, estas vesículas posteriormente pierden dicho recubrimiento. Las NPs que ingresan por esta vía generalmente terminan en los lisosomas donde son degradadas^{12,16}.

La *endocitosis dependiente de caveolina* es un proceso endocítico que involucra invaginaciones de la membrana plasmática de 50-80 nm llamadas caveolas cuya formación es mediada por proteínas integrales de membrana llamadas caveolinas ^{11,16}. La *endocitosis independiente de clatrina y caveolina* implica varias vías endocíticas relacionadas con la presencia de dominios lipídicos en la membrana celular (40-50 nm de diámetro) llamados “balsas lipídicas” ⁴⁶.

El mecanismo de internalización de NPs y su posterior tráfico al interior de la célula depende de las propiedades fisicoquímicas de las NPs y de la línea celular e incluso se puede dar la internalización por diferentes vías de manera simultánea ¹². Después de la entrada de las NPs a la célula a través de diferentes vías endocíticas, su destino final está determinado por los mecanismos de tráfico intracelular mediados principalmente por una red de endosomas celulares en conjunción con el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y los lisosomas. Los endosomas generalmente se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células humanas y pueden ser clasificados en tres tipos principales: endosomas tempranos, endosomas de reciclaje y endosomas tardíos ¹⁶. La identidad de los endosomas individuales está influenciada por la presencia de Rab GTPasas y fosfoinosítidos específicos, que coordinan el tráfico de membrana y facilitan las funciones endosómicas ⁴⁷. Después de la endocitosis, Rab5 (una proteína de señalización) se une a las vesículas endocíticas y luego interactúa con EEA1 (*Early endosome antigen 1*) en los endosomas tempranos. Las vesículas endocíticas se acidifican a través de ATPasas H⁺ tipo V, reduciendo el pH desde un pH extracelular de 7.4 hasta ~6.3. Los endosomas tempranos actúan como estaciones de clasificación hacia diferentes destinos celulares. Parte de su carga se reciclará a la membrana en pequeñas vesículas fusionándose con los endosomas de reciclaje, en donde están involucrados Rab adicionales, como Rab11 y Rab4 (liberando su contenido fuera de la célula en forma de exosomas). El resto de la carga permanece en los endosomas tempranos, que luego continúan acidificándose a pH 5.5, y a medida que los endosomas maduran, Rab5 se reemplaza por Rab7 mediando la fusión con los endosomas tardíos y los lisosomas (pH 4.7) cuyo contenido queda expuesto a una variedad de enzimas de degradación como las hidrolasas ácidas lisosomales ^{12,16,47}.

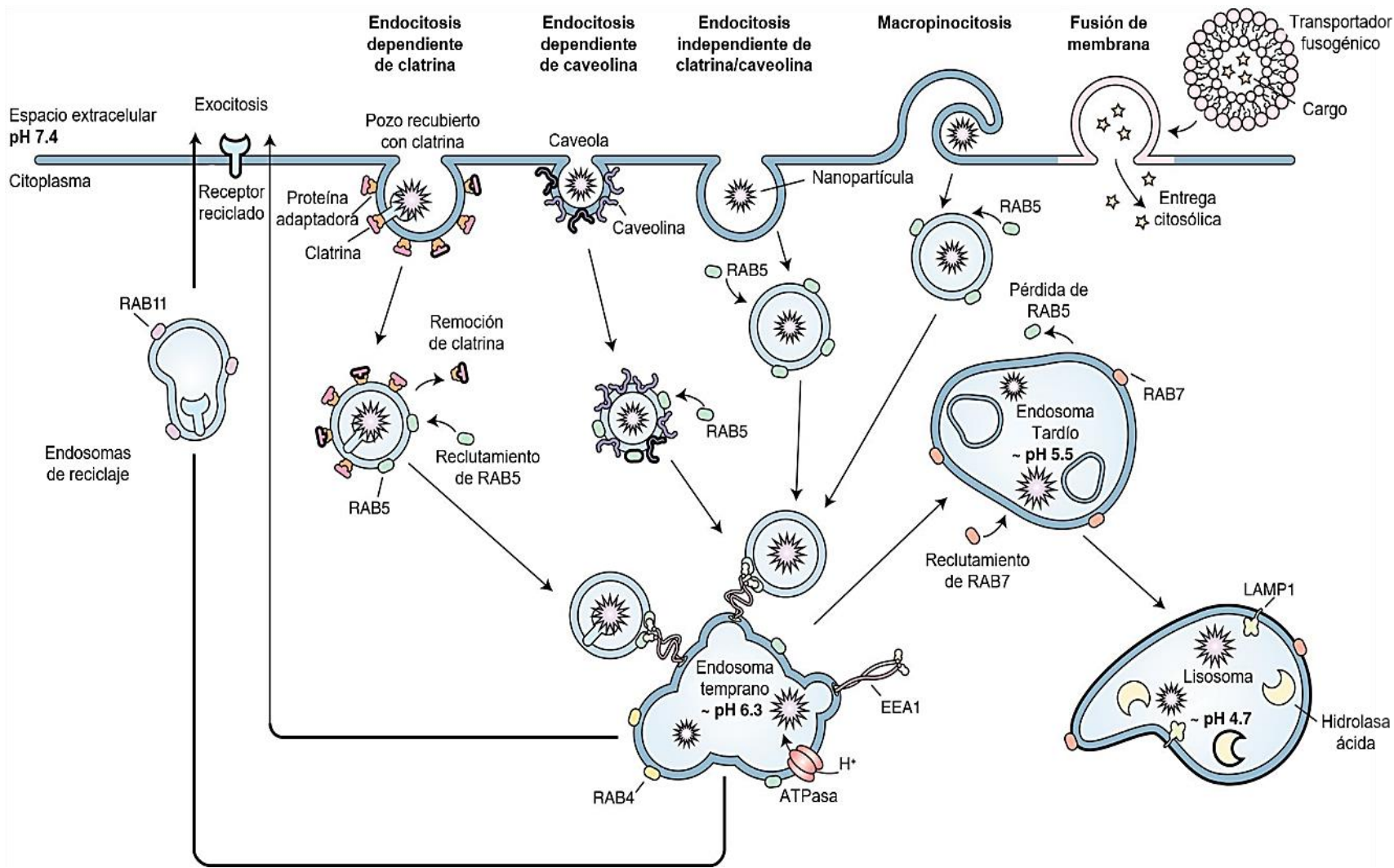


Figura 1-3. Esquema de las rutas de endocitosis y exocitosis de nanopartículas ¹².

1.1.6 Mecanismos de escape endosomal

Aunque a menudo se hace énfasis en la importancia de la internalización de las NPs en las células, escapar de los endosomas es quizá la barrera más desafiante para la entrega de los cargos en los sitios objetivo y existe poco consenso en la literatura sobre los mecanismos implicados ^{12,48}.

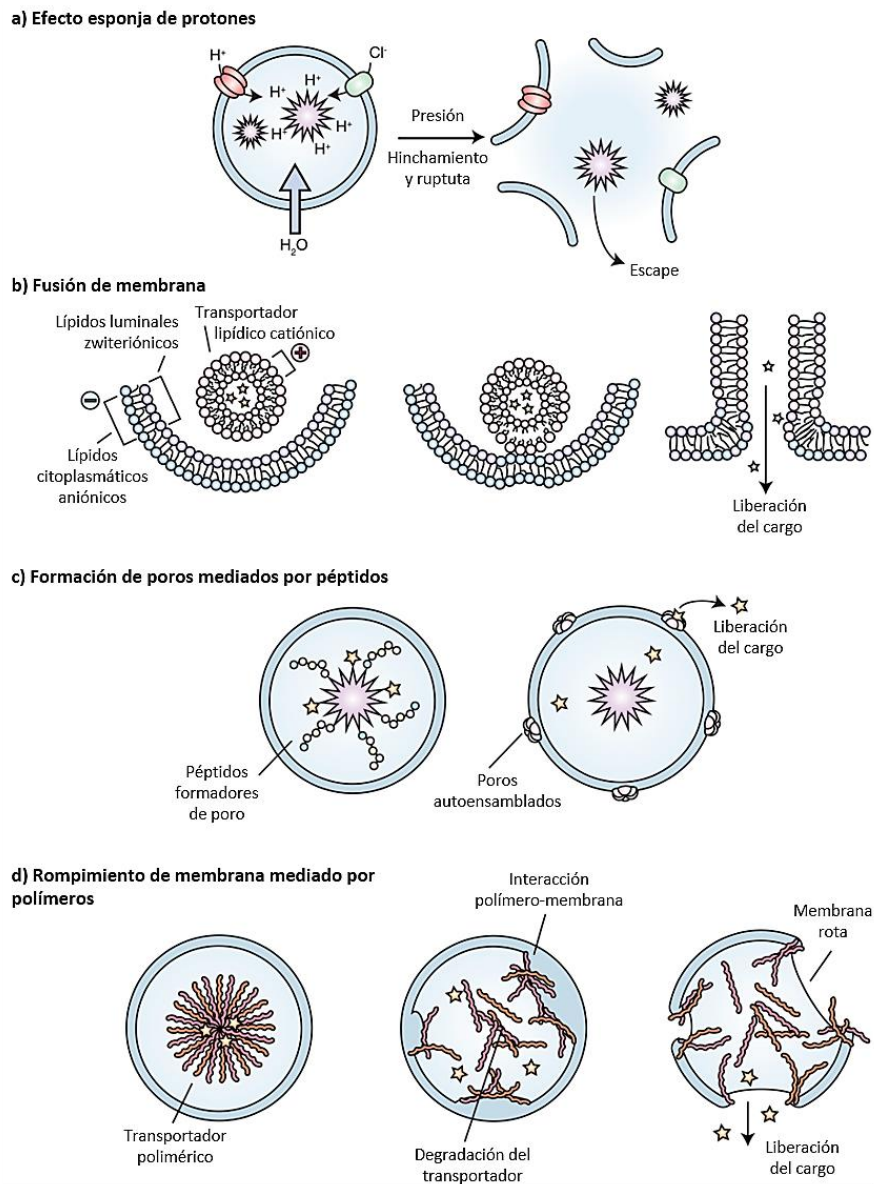


Figura 1-4. Mecanismos de escape endosomal. **a)** Efecto esponja de protones. **b)** Fusión de membrana. **c)** Formación de poros mediados por péptidos. **d)** Rompimiento de membrana mediado por polímeros ¹².

Dentro de los mecanismos que han sido propuestos para inducir escape endosomal están: el *efecto de esponja de protones*, el cual se basa en el efecto de amortiguación del pH de algunos polímeros que se protonan, en donde a medida que las ATPasas bombean protones a los endosomas, iones cloruro y moléculas de agua también se bombean al endosoma para mantener el equilibrio de carga, dando como resultado una alta presión osmótica provocando hinchamiento y ruptura del mismo (**Figura 1-4a**)¹². En el mecanismo de *fusión de membrana*, lípidos aniónicos del lado citoplasmático de los endosomas se reorganizan para formar pares iónicos neutros con lípidos catiónicos del portador, lo que conlleva a que las membranas se fusionen y se liberen los cargos en el citoplasma (**Figura 1-4b**)¹². En el mecanismo de *formación de poros mediados por péptidos*, diferentes péptidos se pueden autoensamblar a la membrana lipídica para formar poros, a través de los cuales se pueden liberar los cargos (**Figura 1-4c**)¹². Finalmente, en el mecanismo de *rompimiento de la membrana*, polímeros o péptidos pueden interactuar directamente con la membrana endosómica, causando ruptura de la misma y liberación del cargo (Figura 1-4d)¹².

1.1.7 Bioconjugación

En su aspecto más fundamental, la bioconjugación simplemente implica la reacción de dos moléculas y un agente de conjugación que une covalentemente los componentes. En algunos esquemas de conjugación se utiliza un agente de activación que da como resultado la unión de dos moléculas sin que intervenga un entrecruzante entre ellas. En la mayoría de los casos, al menos una de las moléculas es de origen biológico o es un fragmento o derivado de una biomolécula. En algunas situaciones, el conjugado que se forma es completamente sintético, pero su uso está dirigido a aplicaciones biológicas⁴⁹. La bioconjugación puede proteger a la molécula del fármaco de la degradación, además de ofrecer posibilidades de entrega dirigida y liberación controlada del fármaco o terapia.

Las NPs a menudo se bioconjugan a péptidos penetrantes de células (*Cell-penetrating peptides* o CPPs por sus siglas en inglés) o moléculas con actividad de membrana, para incrementar la capacidad de translocar la membrana celular sin afectar su integridad. Los CPPs, generalmente son péptidos cortos (menos de 30 residuos de aminoácidos) cargados positivamente. El mecanismo de internalización celular es complejo, pero en

general se cree que posiblemente se adsorben en la membrana celular por medio de interacciones electrostáticas, seguido por interacciones con los fosfolípidos y su eventual internalización celular por diferentes vías endocíticas, como macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por caveolas ¹¹.

1.1.8 Buforinas

Las histonas, además de sus funciones en el núcleo de la célula como proteínas encargadas del empaquetamiento y la regulación de los genes en eucariotas, también cumplen funciones extracelulares relacionadas con el sistema inmune innato ⁵⁰. La Buforina I es el primer péptido antimicrobiano derivado de una histona, aislado del sapo asiático *Bufo gargarizans* (**Figura 1-5**). Este péptido consta de 39 aminoácidos, idéntico en 37 de los 39 residuos del N-terminal de la histona H2A. La Buforina II, que consta de 21 aminoácidos, fue derivado de la Buforina I y de acuerdo a lo reportado, muestra mayor actividad antimicrobiana y capacidad de cruzar membranas bilógicas sin inducir una permeabilización severa (**Tabla 1-1**) ⁵¹.

Tabla 1-1. Comparación de la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la histona H2A de *Xenopus* con Buforina I y Buforina II.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
N-terminal de histona H2A	SGRGKQGGKTRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLLRKGNYAERV-
Buforina I	AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLLRKGNV
Buforina II	TRSSRAGLQFPVGRVHLLLRK

Por otra parte, se ha demostrado que el residuo 11 de prolina (P) induce un cambio en la estructura secundaria de hélice α de la Buforina II, lo cual es una característica estructural clave para la capacidad de translocar la membrana celular (**Figura 1-5**) ⁵². Sin embargo, este péptido altamente susceptible a la degradación proteolítica por proteasas endógenas, lo cual reduce su tiempo de vida media *in vivo* ²⁹. Una estrategia para mejorar la estabilidad y la vida media de este tipo de moléculas con estructuras susceptibles a la degradación es conjugándolas a vehículos de administración de fármacos como son los materiales nanoestructurados ^{28,29}. Los materiales nanoestructurados proporcionan un blindaje estérico frente a la degradación proteolítica, mientras que el aumento del tamaño reduce el aclaramiento renal prolongando la vida media en circulación.

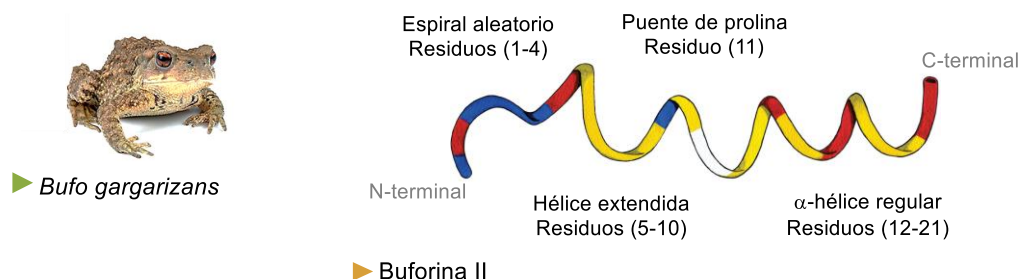


Figura 1-5. Representación de la estructura de la BUF-II en medio hidrofóbico; la BUF-II es derivado de la BUF-I aislado inicialmente del sapo *Bufo gargarizans*, de donde deriva su nombre.¹

1.1.9 OmpA

Otra familia de moléculas que tienen potencial como agentes de penetración celular son las proteínas de la membrana externa (OMPs, del inglés *Outer Membrane Proteins*) de las bacterias gramnegativas. La proteína de membrana externa A (*OmpA*) de *Escherichia coli* (*E. coli*) y de otras enterobacterias, cumple diversas funciones como la conjugación bacteriana, mantener la integridad de la membrana y permitir la permeabilidad selectiva de las membranas. Estructuralmente, la proteína *OmpA* (**Figura 1-6**) está formada por dos dominios: el dominio N-terminal, en donde los residuos 1-171 forman un β-barril de 8 láminas en arreglo antiparalelo conectados por 4 bucles largos en la membrana exterior y tres vueltas cortas en el espacio periplasmático; mientras que los residuos 172-325, del dominio C-terminal es globular y proporcionan el sitio de unión para el peptidoglicano periplasmático. La proteína *OmpA* se aproxima a un cilindro con un diámetro de 2,6 nm y una longitud de 5,7 nm^{53,54}.

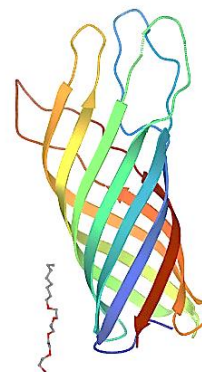


Figura 1-6. Representación de la estructura de la proteína *OmpA* de *E. coli* (cepa K12) (UniProtKB - P0DJO6 (OMPA_SHIBL)).

¹ Los residuos de aminoácidos están coloreados como sigue: residuos cargados positivamente, rojo; otros residuos hidrofílicos, azul; prolina, blanca; otros residuos hidrofóbicos, amarillo.

2.Estado del arte

En los sistemas de administración de terapias, las SNPs compiten con materiales biológicos (e.g., lípidos, proteínas), distintos polímeros sintéticos (e.g., dendrímeros, liposomas catiónicos, polietilenglicol, ciclodextrina), materiales carbonáceos (e.g., fullerenos, óxidos de grafeno y nanotubos de carbono), nanopartículas inorgánicas (oro, plata), óxidos metálicos (e.g., óxidos de hierro, alúmina), entre otros ^{1,55}. Sin embargo, algunas características de la sílice como su alta estabilidad térmica, inercia química, inmunidad a ataques microbianos, alta hidrofiliidad y biocompatibilidad, fácil funcionalización y alta capacidad de carga, hacen éste material especial y difícil de superar ². Recientemente se han empleado SNPs para la administración dirigida de agentes de contraste y fármacos, biosensores, administración de ADN e inmovilización de enzimas con fines diagnósticos y para terapia de enfermedades ⁵⁶.

En cuanto a los sistemas basados en fullerenos, estos han sido utilizados para investigar la liberación de agentes quimioterapéuticos buscando eliminar los efectos secundarios de fármacos como la doxorubicina y el paclitaxel, fotosensibilizadores para la activación de especies reactivas de oxígeno para el tratamiento de células cancerígenas, liberación de ácidos nucleicos, fármacos con actividad anti VIH-1, liberación transdérmica, fullerenoles con actividad antioxidante, fármacos cardiovasculares y liberación en cerebro (**Figura 2-1**)

²¹.

Dada la necesidad de mantener hidrofilia para aplicaciones biológicas, se han desarrollado varios métodos para este propósito, que incluyen la síntesis de derivados de fullerenos, polímeros de fullerenos, encapsulación en portadores especiales (e.g., ciclodextrinas, calixarenos, polivinilpirrolidona, micelas, liposomas, etc.), modificación química mediante adición de sustancias con carácter hidrofílico como aminoácidos, ácidos carboxílicos, polímeros anfifílicos y grupos polihidroxilos, estos últimos llamados fullerenoles o fulleroles

⁵⁷.

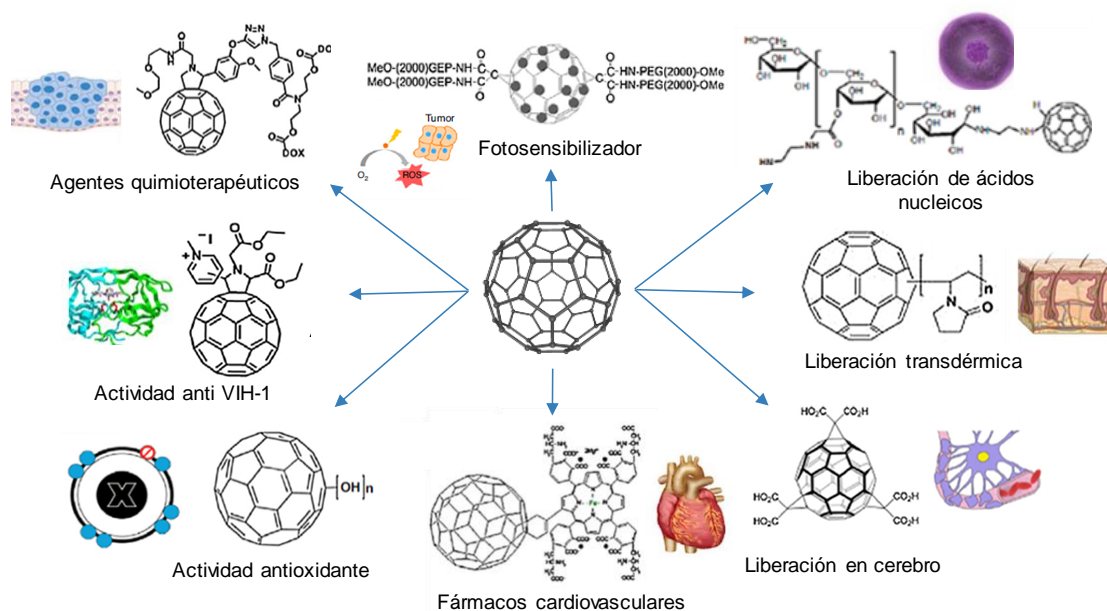


Figura 2-1. Algunos sistemas de liberación de cargos basados en fullerenos ²¹.

Los fullerenoles se consideran los derivados de fullereno solubles en agua más prometedores debido a la simplicidad de su síntesis en comparación con otros derivados de fullereno solubles en agua, así como a su posible aplicación como precursores para la creación de nanomateriales más complejos ⁵⁸. Para la síntesis de fullerenoles se han desarrollado varios métodos (**Figura 2-2**), e.g., a partir de derivados de fullereno policiclosulfatado ⁵⁹, mediante catalizadores de hidróxido de amonio cuaternario ⁶⁰, mediante reacción con peróxido de hidrógeno e hidróxido de sodio ^{61,62}, y síntesis mediada por ultrasonido ⁶³. Para el fullereno sintetizado en esta investigación se siguió un método previamente reportado por Kokubo *et. al.*, el cual se basa principalmente en una reacción de un solo paso a partir de fullereno C_{60} por hidroxilación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de un catalizador de transferencia de fase —hidróxido de Tetra-n-butilamonio (TBAH)— en condiciones de bicapa orgánica/acuosa ⁶⁴.

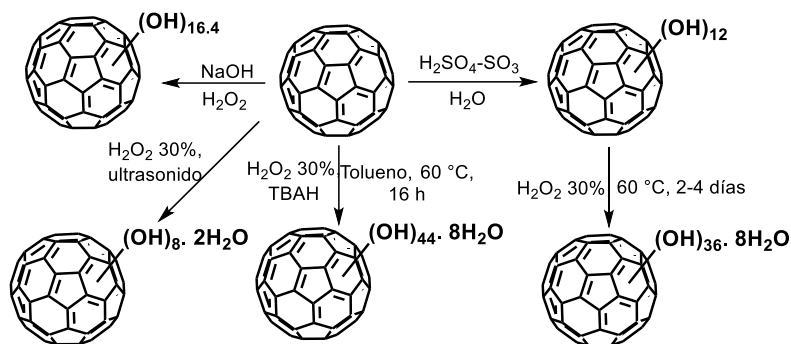


Figura 2-2. Diferentes métodos para la obtención de fullerenoles ⁶⁵.

Por otra parte, para el desarrollo de los sistemas de entrega de material terapéutico, es bien sabido que las propiedades fisicoquímicas de las NPs, como la composición, el tamaño, forma, carga superficial y funcionalización de la superficie, desempeñan un papel clave en el direccionamiento de sus interacciones con la célula ¹⁶. Por ejemplo, Planque *et al.*, reportaron que la permeabilidad y la integridad de la membrana dependen en gran medida del tamaño y la química de la superficie de las NPs ⁶⁶. En este sentido, no hay un consenso con respecto a un tamaño óptimo que maximice la internalización celular ¹¹. Diferentes estudios sugieren que NPs de ~50 nm logran la mayor absorción en ciertos tipos de células ^{67,68}, pero modelos teóricos sugieren un umbral más bajo ⁶⁹. Sin embargo, se ha observado que NPs con dimensiones muy pequeñas pueden generar efectos citotóxicos ⁷⁰.

En la síntesis de SNPs por el método de Stöber *et al.*, el tamaño y distribución de tamaño de partícula se pueden controlar mediante varios parámetros, cómo la relación molar de los precursores, concentración del catalizador y la temperatura ⁷¹. Por otra parte, los fullerenoles tienden a formar agregados en un rango de tamaño entre 10-50 nm ⁷².

Además del tamaño, la forma es otra propiedad de las NPs con incidencia importante en la internalización celular. Aunque se han desarrollado métodos para síntesis de NPs de diferentes morfologías (e.g., esferas, barras, cintas, triángulos, hexágonos, discos, octaedros, trípodes, estrellas, etc), los nanotransportadores de forma esférica son los más comunes y más ampliamente utilizados ⁷³.

Las interacciones electrostáticas entre las NPs cargadas y la membrana celular son igualmente de gran importancia biológica. Por ejemplo, Li *et al.*, mediante simulación de dinámica molecular mostraron una interacción más favorable de NPs catiónicas con la membrana celular, que su contraparte no cargadas ⁷⁴. Cho *et al.*, reportaron que la tasa de internalización de NPs de oro catiónicas en células SK-BR-3 es más de cinco veces mayor que las aniónicas, y también demostraron que las NPs catiónicas se difunden en las células a través de vías no endocíticas generando agujeros u otras interrupciones en la membrana celular, mientras que las NPs aniónicas o neutras se internalizan en éstas células solo a través de endocitosis ⁷⁵.

Quizás la funcionalización de la superficie de las NPs sea el parámetro principal involucrado en la interacción de las NPs con la célula y su posterior internalización ⁷⁶.

Cuando las NPs se dispersan en fluidos biológicos, diversos tipos de biomoléculas (principalmente proteínas) se adsorben sobre las NPs, formando lo que se conoce como corona de proteínas, afectando la internalización de las NPs. Una estrategia para evitar la formación de la corona de proteínas que ha sido utilizada es funcionalizar las NPs con poli(etilenglicol) (PEG), alcohol polivinílico, poliaminoácidos y polisacáridos ⁷⁷.

Las NPs suelen acoplarse a moléculas específicas de direccionamiento en la superficie para alcanzar alta especificidad, tener tiempos de circulación elevados, permitir una liberación controlada de cargos y extender de manera efectiva su tiempo de acción ⁷⁸.

Ruter *et. al*, identificaron la proteína YopM, una OMP con habilidad de penetrar las membranas celulares de varios tipos de células y sugieren su uso potencial como herramienta para entregar proteínas a nivel celular ⁷⁹.

Como se mencionó anteriormente, Lopez-Barbosa *et al.*, inmovilizaron OmpA en NPs de magnetita. Estos nanobioconjugados mostraron capacidad de translocar membranas lipídicas modelo de lecitina de huevo; además, baja citotoxicidad y baja tendencia hemolítica ³⁰.

Akishiba *et. al.*, reportaron una nueva clase de péptidos que actúan simultáneamente como péptidos de penetración celular y péptido endosomolítico, capaz de atravesar las membranas a través de macropinocitosis, romper los endosomas y liberar su cargo en el citosol ⁸⁰.

En este sentido, Cuellar *et. al.*, sugieren que el nanobioconjugado BUF-II-magnetita transloca la membrana celular y tiene capacidad de escapar las rutas endocíticas de inclusión celular con eficiencias entre 40-70% dependiendo de la línea celular, pero con pérdida de la actividad antimicrobiana nativa de BUF-II ²⁸. Posteriormente para superar este problema, Perez *et al.*, conjugaron el péptido con ayuda de un espaciador flexible de polieteramina. Al introducir este espaciador de superficie, los residuos de BUF-II responsables de la actividad antimicrobiana siguen siendo en gran medida accesibles para interactuar con componentes intracelulares de las bacterias y eventualmente comprometer su viabilidad ²⁹.

En la **Figura 2-3** se resumen algunos materiales que se han explorado como plataformas para la liberación de material terapéutico, junto con ilustraciones de propiedades fisicoquímicas que se deben controlar para mejorar la eficacia de estos.

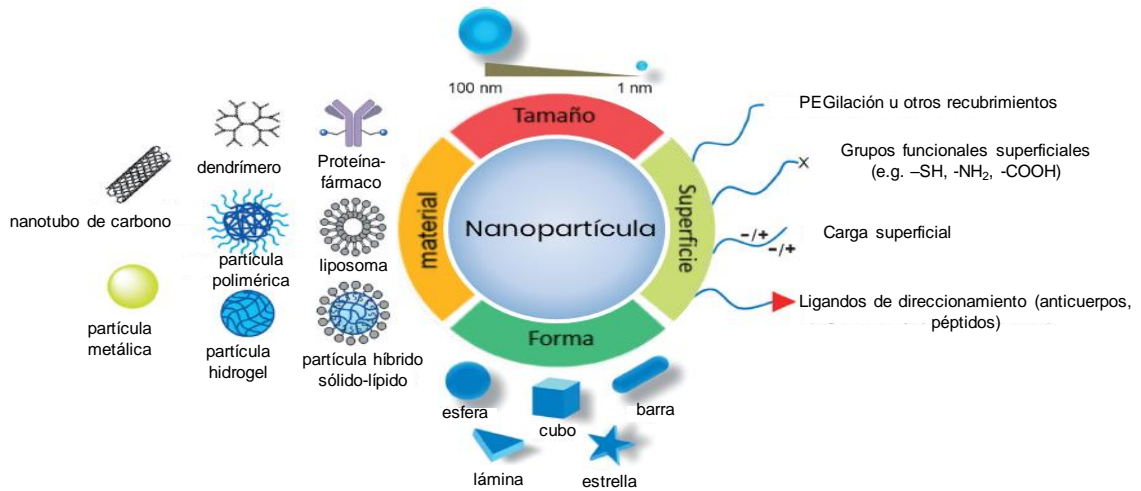


Figura 2-3. Resumen de algunos nanotransportadores que se han explorado para la administración de material terapéutico, junto con ilustraciones de sus propiedades fisicoquímicas ⁸¹.

3. Problema de investigación

El principal desafío para la liberación de terapias a nivel celular es la falta de vehículos de liberación adecuados para llegar a diferentes tipos de células, superando las barreras biológicas que limitan la entrega. El Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Los Andes ha venido trabajando durante los últimos años en torno al desarrollo de vehículos de entrega de cargos a nivel celular. Como resultado de dichas investigaciones, se desarrollaron dos vehículos de penetración celular. El primero emplea el péptido BUF-II como agente con actividad de membrana para lograr el paso de la membrana celular de células mamíferas y bacterianas ²⁸. El segundo vehículo emplea la porina de *E. coli* OmpA para lograr la translocación de membranas liposomales ³⁰. En ambos casos, los vehículos desarrollados se sintetizaron a través de la inmovilización del agente con actividad de membrana en NPs de magnetita. El uso de sistemas nanoestructurados se debe principalmente a que las NPs se incorporan activamente a la célula a través de diferentes mecanismos ¹⁶.

La efectividad de penetración y distribución intracelular de los sistemas de entrega de cargos se encuentra, no solamente asociada con la actividad de las moléculas inmovilizadas, sino también con el nanomaterial transportador y con el tipo de célula blanco ^{82,83}. Por lo tanto, el diseño y desarrollo de estos sistemas de entrega implica explorar diferentes NPs y el ajuste cuidadoso de sus propiedades fisicoquímicas. Estas incluyen la composición, el tamaño, la forma, la carga superficial y la química de superficie, principalmente ¹¹. Adicionalmente, deben cumplir con ciertas características como: capacidad de eludir la membrana celular, escape a la ruta endosomal, biodegradabilidad, biocompatibilidad y adicionalmente ser capaz de proteger el cargo y entregarlo de manera controlada y localizada ⁸⁴.

Las SNPs son de particular interés debido a su facilidad de síntesis y funcionalización superficial que permite conjugar virtualmente cualquier tipo de molécula o biomolécula de interés. Adicionalmente, este tipo de partículas son poco citotóxicas e inmunogénicas y han sido aprobadas para ensayos clínicos ². De igual forma, los fullerenoles tienen una estructura única y poseen propiedades adecuadas para la interacción con el entorno celular ²¹.

En el presente proyecto se planteó entonces la conjugación de las moléculas con actividad de membrana que ya han sido exitosamente probadas (BUF-II y OmpA) a SNPs y fullerenol y comprender su comportamiento *in vitro* en células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202) como modelos para evaluar la translocación de la membrana celular, escape a la ruta endosomal y biocompatibilidad.

Por tanto, se planteó responder la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de conjugar SNPs y fullerenol con el péptido de penetración celular BUF-II o con la proteína transmembranal OmpA, sobre su internalización, escape endosomal y la citotoxicidad en células THP-1 (ATCC® TIB-202) y Vero (ATCC® CCL-81)?

Responder esta pregunta de investigación permitió evaluar estos nanobioconjugados como potenciales vehículos de penetración celular.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar nanobioconjugados con base en SNPs y fullerenol, BUF-II y la proteína de membrana externa (OmpA), con potencial uso como vehículos de liberación de cargos a nivel celular.

4.2. Objetivos específicos

- Establecer una metodología de síntesis para SNPs y fullerenol con características deseables (forma, tamaño, carga superficial) para desarrollar vehículos de liberación de cargos a nivel celular.

Indicador: Procedimiento detallado para la síntesis de las SNPs y el fullerenol.

- Realizar la caracterización estructural, composición, de morfología y tamaño de las SNPs y el fullerenol sintetizados.

Indicador: Resultados de FTIR, SEM, TEM, DLS, TGA de las SNPs y fullerenol sintetizados.

- Conjuguar las NPs sintetizadas, con el péptido de penetración celular BUF-II y con la proteína OmpA y confirmar la formación correcta de los nanobioconjugados.

Indicador 1: Procedimiento detallado para para conjuguar las SNPs y el fullerenol con el péptido de penetración celular BUF-II y con la proteína OmpA.

Indicador 2: Resultados de FTIR, SEM, TEM, DLS, TGA de los nanobioconjugados.

- Realizar la evaluación biológica de los nanobioconjugados, liberándolos en células Vero (ATCC® CCL-81), THP-1 (ATCC® TIB-202) y en presencia de glóbulos rojos

y plaquetas como modelos para evaluar la translocación de la membrana celular y escape endosomal, citotoxicidad y hemocompatibilidad.

Indicador: Resultados de la liberación de los dos nanobioconjugados en células Vero (ATCC® CCL-81), THP-1, glóbulos rojos y plaquetas.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales

Tetraetil ortosilicato (TEOS) (98%), metanol, amoniaco solución (30-32%), hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (25%), (3-Aminopropil) trietoxisilane (APTES) (98%), glutaraldehído (25%), N-hidroxisuccinimida (NHS) (98%), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, clorhidrato (EDC) (98%), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de Tetra-n-butilamonio (TBAH) (40% en agua), fullereno C₆₀, y ácido acético glacial, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (MO, USA). Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) solución 32% fue adquirido de Merck (Darmstadt, Germany). Buforina II (BUF-II-TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK) fue adquirido de GL Biochem Shanghai (Shanghai, China). Células Vero (ATCC® CCL-81), y THP-1 (ATCC® TIB-202) fueron usadas para los ensayos de liberación. MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato), y LysoTracker Green DND-26 fueron adquiridos de Thermo Scientific (MA, USA). Los medios *Dulbecco's modification of Eagle medium* (DMEM), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, y suero bovino fetal (FBS) fueron obtenidos de Biowest (MO, USA).

La proteína OmpA fue producida por el Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Los Andes, para lo cual fue sobreexpresada en *E. coli* siguiendo el protocolo de Aguilera-Segura *et al.*,⁸⁵. Resumiendo, se cultivó *E. coli* K-12 W3110/pCA24N OmpA+34 en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían extracto de levadura (5g/L), bacto triptona (10g/L), cloruro de sodio (10g/L), y cloranfenicol (50µg/mL) y se incubó a 37 °C durante la noche. Posteriormente, se inoculó una colonia en 50 mL de medio LB con cloranfenicol y se incubó a 37 °C durante 16 horas y 250 rpm. Seguidamente, se inocularon 19,5 mL de medio LB fresco con 500 µL del cultivo anterior en las mismas condiciones. Cuando se alcanzó una densidad óptica (DO)₆₀₀ nm= 0,7 se añadió isopropiltio-β-galactósido (IPTG) 2 mM, para inducir la expresión de la proteína. La exposición a IPTG

se realizó durante 3 horas. Para la purificación, se obtuvo del cultivo un *pellet* de *E. coli* sobreexpresando OmpA y se añadió a un tampón de lisis en una proporción de 4 mL/g y se sonicó en hielo, durante 40 minutos. La solución obtenida se centrifugó a 13000 rpm y 4 °C durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. La purificación se logró exponiendo el sobrenadante al kit *Dynabeads® TALON®* (Invitrogen) ya que la proteína OmpA se clonó con una cola de histidina adicional. La presencia de OmpA purificada se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), que mostró una única banda en 31 kDa que concuerda bien con el peso molecular de OmpA. La concentración se midió con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) a 280 nm.

5.2 Equipos empleados para la caracterización de los materiales sintetizados

Los espectros UV-visible se obtuvieron con un espectrómetro GENESYS 10S UV-vis (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Los espectros infrarrojos se obtuvieron con un espectrofotómetro Bruker Alpha II FTIR Eco-ATR (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), se tomaron en un rango de 4000-500 cm^{-1} con una resolución espectral de 2 cm^{-1} . El tamaño y carga de las NPs fue determinado a través de Dispersión Dinámica de Luz y movilidad electroforética (Zeta-Sizer Nano-ZS; Malvern Instruments, Malvern, UK). Análisis termogravimétrico (TGA, TA Instruments, New Castle, DE, USA), fue usado para estimar la cantidad de material conjugado a las SNPs y fullerenol, implementando una rampa lineal de temperatura a una velocidad de 10 °C/min de 25 a 900 °C, bajo atmósfera inerte. Las micrografías electrónicas se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscopy (SEM)*) (TESCAN LYRA 3 FIB-SEM, República Checa), y un microscopio electrónico de Transmisión (*Transmission Electron Microscope (TEM)*) FEI TECNAI G² F20 Super Twin TMP, (Hillsboro, OR, USA). Las mediciones de RMN se obtuvieron con un espectrofotómetro Spinsolve 43 MHz (Magritek, Alemania). Las mediciones de Difracción de rayos X fueron realizadas con un difractorómetro PANalytical X'Pert Pro MPD equipado con un haz de Cu-K α 1 (1,54 Å) y un detector de estado sólido de alta velocidad denominado PIXcel RTMS y un voltaje de 45kV. La liberación en células se monitoreó usando un microscopio de barrido láser confocal (Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japón) con un objetivo de inmersión en aceite PlanApo 60 x, 1,35 NA. Longitudes de onda de Excitación/Emisión de 405 nm/422 nm, 488 nm/520 nm, y 559

La reacción implica la hidrólisis y policondensación de TEOS en una mezcla de amoníaco en solución, alcohol y agua. Brevemente, en una cabina de flujo laminar y usando material estéril, se mezcló agua tipo I (Agua ultrapura con una resistividad $>18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$, y conductividad $<0,056 \mu\text{S/cm}$) (1,5 mL), y metanol (66,3 mL). Se adicionó TEOS (0.9 mL) y se sometió a ultrasonido por 20 minutos (Elmasonic EASY 60H, 37 kHz, 150 W), posteriormente se adicionó amoníaco 30% en solución acuosa (4,5 mL) y se dejó la mezcla en ultrasonido durante otros 60 minutos en los cuales se formó una suspensión turbia de color blanco. Las SNPs obtenidas se centrifugaron en tubos Eppendorf a 14500 rpm por 20 minutos, usando una Micro Centrifuga Z 216 M (Hermle Labortechnik GmbH). Posteriormente, se retiró el sobrenadante con una micropipeta y al pellet residual en el tubo se le adicionó agua tipo I, se resuspendió y se repitió una vez más el procedimiento de lavado, centrifugación-resuspensión. Para la obtención de las SNPs silanizadas, se procedió de manera similar con la modificación de adicionar 5% de APTES por un 95% de TEOS (**Figura 5-1**)⁸⁶

5.3.2 Bioconjugación de Buforina II en las SNPs silanizadas

Con el objetivo de conferir libertad de movimiento a la BUF-II conjugada a las SNPs, aumentando así la probabilidad de interactuar con los sitios diana, se empleó el espaciador amina-PEG₁₂-ácido propiónico, que tiene una longitud de aproximadamente 4,68 nm⁸⁷. Los grupos amino de las SNPs silanizadas se pueden acoplar con los grupos amino terminales del espaciador, usando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Las partículas modificadas con APTES, como en este caso, son particularmente buenas para posteriores modificaciones con reactivos basados en PEG⁸⁸. BUF-II se conjugó a los grupos carboxilo del espaciador por su región N-terminal empleando EDC como agente entrecruzante. El EDC reacciona primero con un grupo carboxilo y forma un intermedio de O-acilisourea que reacciona rápidamente con un grupo amino para formar un enlace amida con la liberación de un subproducto de isourea. El intermedio es inestable en soluciones acuosas, por lo que en el procedimiento de conjugación se empleó la N-hidroxisuccinimida (NHS) para la estabilización (**Figura 5-2**)⁴⁴.

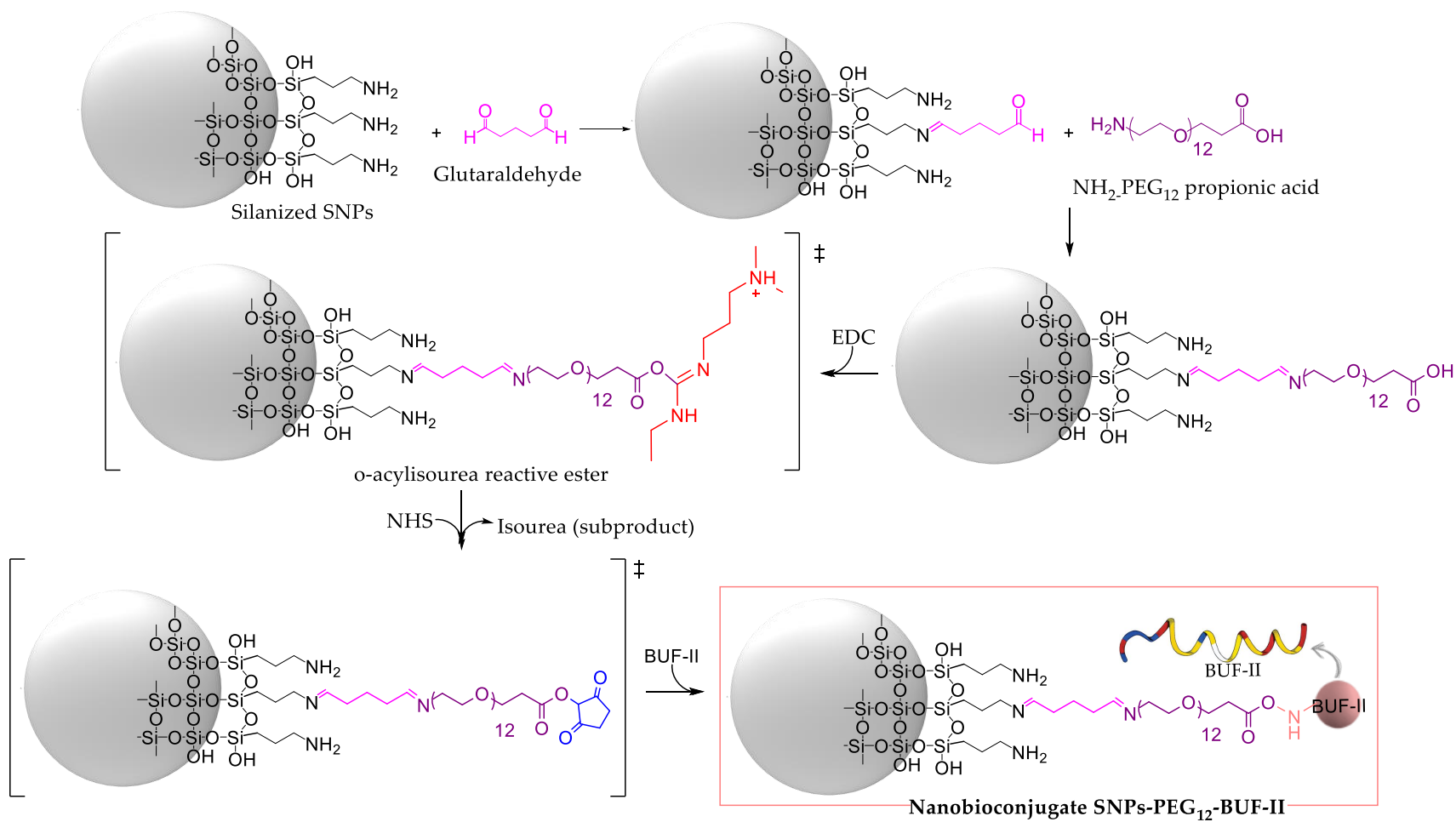


Figura 5-2. Representación esquemática del protocolo seguido para la obtención de los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs ⁴⁴.

Brevemente, se suspendieron 100 mg de SNPs silanizadas en 30 mL de agua estéril y se sometió a ultrasonido por 10 minutos usando un baño ultrasónico (Elmasonic EASY 60H/37 kHz). Seguidamente, se adicionó solución de glutaraldehído (2 mL, 2 % v/v) y sometió a ultrasonido por 1 minuto (Elmasonic EASY 60H/37 kHz). Después, se agitó 1 hora a 220 rpm usando un agitador o *Shaker*. Entonces se adicionó gota a gota amina-PEG₁₂-ácido propiónico (10 mg/3 mL de agua) y sometió a ultrasonido por 1 minuto (Elmasonic EASY 60H/37 kHz), seguidamente se agitó 24 horas a 220 rpm usando un *Shaker*. Posteriormente, se adicionó EDC (15 mg) / NHS (8 mg) y se agitó 15 minutos a 220 rpm usando un *Shaker*. Posteriormente, se adicionó BUF-II (1 mg BUF-II/ 100 mg de SNPs) y se agitó 24 horas a 220 rpm usando un *Shaker*. Para obtener los nanobioconjugados se tuvo en cuenta los cálculos presentados en la información complementaria (ver **anexo A**). Finalmente, los nanobioconjugados se lavaron centrifugando en tubos Eppendorf a 14500 rpm por 20 minutos, usando una Micro Centrifuga Z 216 M (Hermle Labortechnik GmbH). Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y al pellet residual en el tubo se le adicionó agua tipo I (Agua ultrapura con una resistividad >18 MΩ-cm, y conductividad <0,056 μS/cm), se resuspendió y se repitió cuatro veces más el procedimiento de lavado, centrifugación-resuspensión. En la figura 5-2 se muestra la reacción general de conjugación BUF-II-PEG₁₂-SNPs junto a una comparación del tamaño de partícula y de las biomoléculas.

5.3.3 Bioconjugación de OmpA en SNPs silanizadas

La inmovilización de la OmpA en las SNPs se logró mediante el entrecruzamiento de los grupos terminales amino de la proteína con los grupos amino de las SNPs silanizadas, usando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento ⁴³. Para lo cual, se suspendieron 100 mg de NPs silanizadas en 30 mL de agua estéril y se sometió a ultrasonido por 10 minutos usando un baño ultrasónico (Elmasonic EASY 60H/37 kHz). Seguidamente, se adicionó solución de glutaraldehído (2 mL, 2 % v/v) y sometió a ultrasonido por 1 minuto (Elmasonic EASY 60H/37 kHz). Posteriormente, se agitó 1 hora a 220 rpm usando un agitador o *Shaker*. El exceso de glutaraldehído se removió centrifugando en tubos Eppendorf a 14500 rpm por 20 minutos, usando una Micro Centrifuga Z 216 M (Hermle Labortechnik GmbH). Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y al pellet residual en el tubo se le adicionó agua tipo I, se resuspendió y se repitió cuatro veces más el procedimiento de lavado, centrifugación-resuspensión. Posteriormente, se adicionó solución de OmpA (30 mg OmpA/ 100 mg de SNPs) y se agitó 24 horas a 220 rpm usando

un *Shaker*. Finalmente, se repitió el procedimiento de lavado, centrifugación-resuspensión. En la **Figura 5-3** se muestra la reacción general de conjugación OmpA-SNPs.

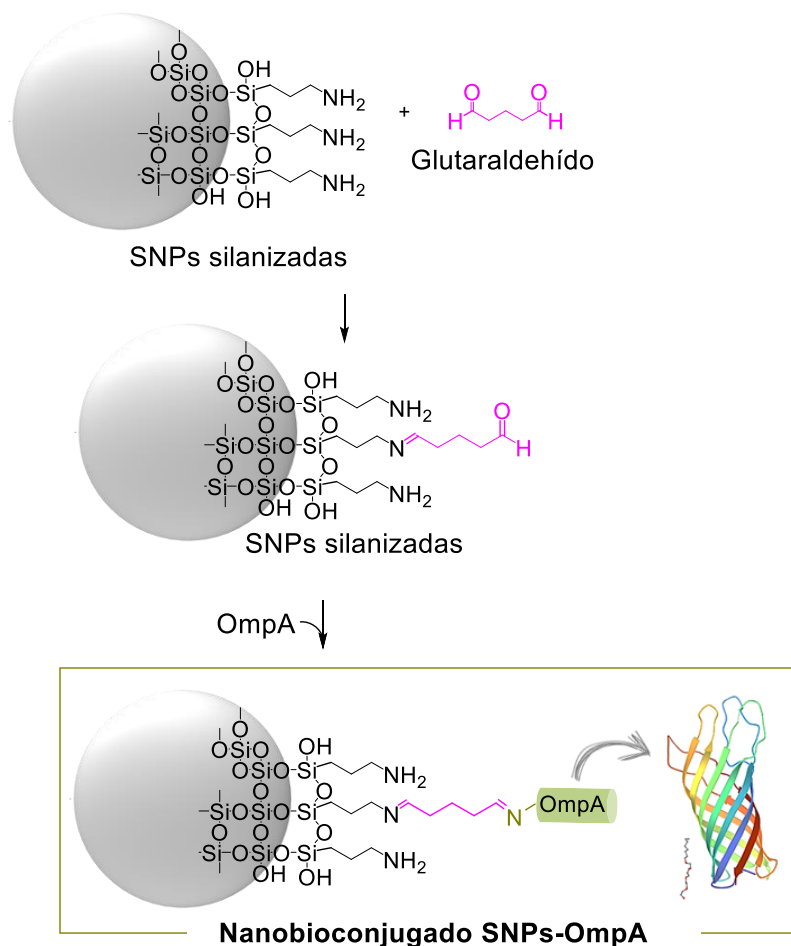


Figura 5-3. Representación esquemática del protocolo seguido para la obtención de los nanobioconjugados SNPs-OmpA^{89,90}.

5.4 Obtención de los nanobioconjugados con base en fullerenol

5.4.1 Síntesis de fullerenol

El fullerenol fue sintetizado mediante un método previamente reportado por Kokubo *et al.*,⁶⁴. Brevemente, a una solución de fullereno C₆₀ (100 mg) en tolueno (50 mL) se adicionó una solución acuosa de peróxido de hidrógeno 30% (10 mL) y TBAH (40 % en agua, 500

μL) y se agitó por 16 horas a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para remover el TBAH, inicialmente se precipitó el fullerenol con 2-propanol, dietiléter y hexano (7:5:5, 85 mL) y se realizaron lavados sucesivos con dietiléter ⁶⁵. Posteriormente el TBAH residual se removió mediante cromatografía en columna, con Florisil como fase estacionaria y agua como fase móvil ^{65,91}, y mediante diálisis ⁹², para lo cual la fase acuosa donde está contenido el fullerenol, se pasó a un tubo de diálisis de membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) en agua tipo II (Agua con una resistividad $>1\text{ M}\Omega\text{-cm}$, y conductividad $<1\text{ }\mu\text{S/cm}$), reemplazando el agua diariamente durante seis días. Posteriormente, el contenido del tubo de diálisis se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizó (Labconco Corporation) obteniéndose un sólido de color amarillo (Conversión: 100%, rendimiento después de la purificación: 75%) (**Figura 5-4**).

Para los ensayos posteriores de conjugación con BUF-II y OmpA, se debió realizar una filtración dispersando el fullerenol en agua tipo I y pasándolo por un filtro de polietersulfona (PES) de $0,22\text{ }\mu\text{m}$; esto con el propósito de asegurar la esterilidad, ya que los ensayos biológicos así lo requieren.

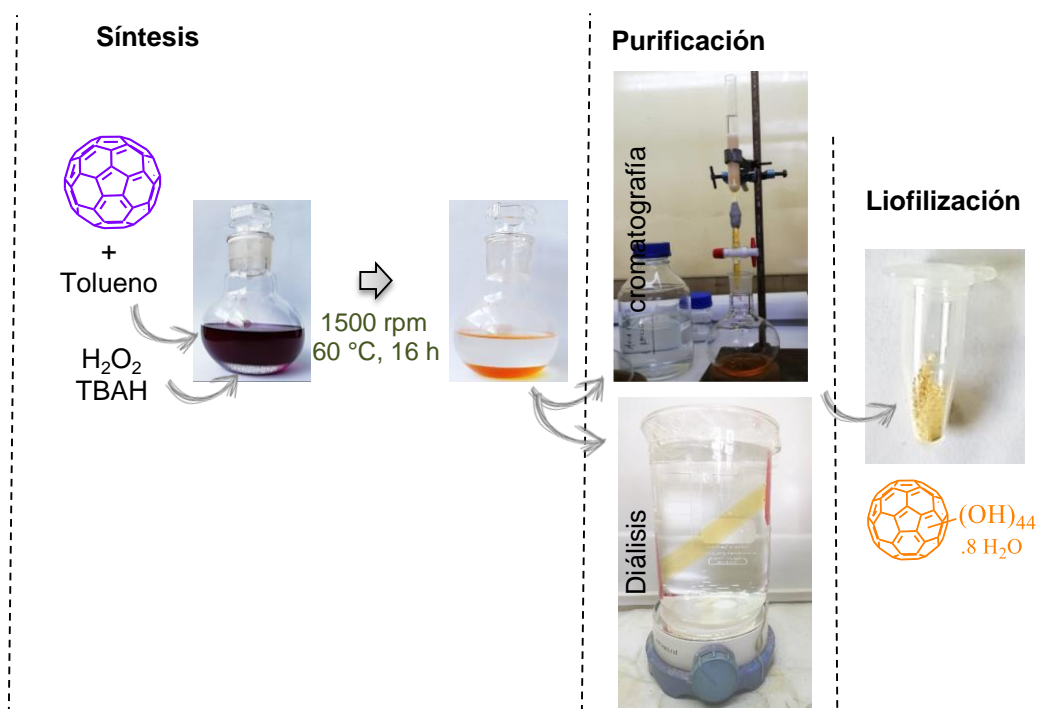


Figura 5-4. Procedimiento de síntesis y purificación del fullerenol.

5.4.2 Silanización del fullereno

Se suspendieron 50 mg de fullereno en 15 mL de agua tipo II (Agua con una resistividad $>1 \text{ M}\Omega\text{-cm}$, y conductividad $<1 \text{ }\mu\text{S/cm}$). A continuación, se añadieron a la suspensión una solución de TMAH (500 μL , 25% (v/v)) y 25 μL de ácido acético glacial y se sometieron a ultrasonido por 10 minutos usando un baño ultrasónico (Elmasonic EASY 60H/37 kHz). Se añadió solución de APTES (500 μL , 20% (v/v)) a la suspensión de fullereno y se agitó a 300 rpm y 60 °C por 60 minutos. El fullereno silanizado se lavó con agua tipo II para eliminar el exceso de APTES ⁴⁹. La **Figura 5-5** muestra un esquema del procedimiento de silanización del fullereno.

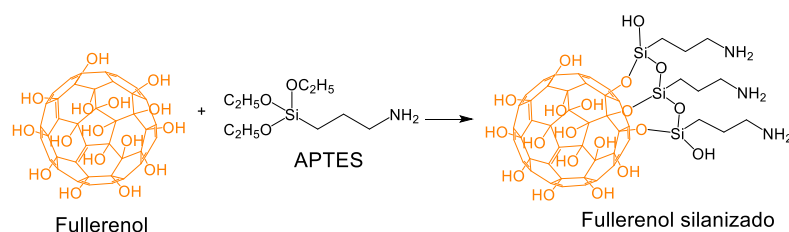


Figura 5-5. Proceso de silanización del fullereno.

5.4.3 Bioconjugación de Buforina II en las NPs de fullereno silanizadas

Para la conjugación de BUF-II al fullereno silanizado, se empleó un protocolo similar al descrito en la sección 5.3.2. En la **Figura 5-6** se muestra la reacción general de conjugación BUF-II-NPs de fullereno.

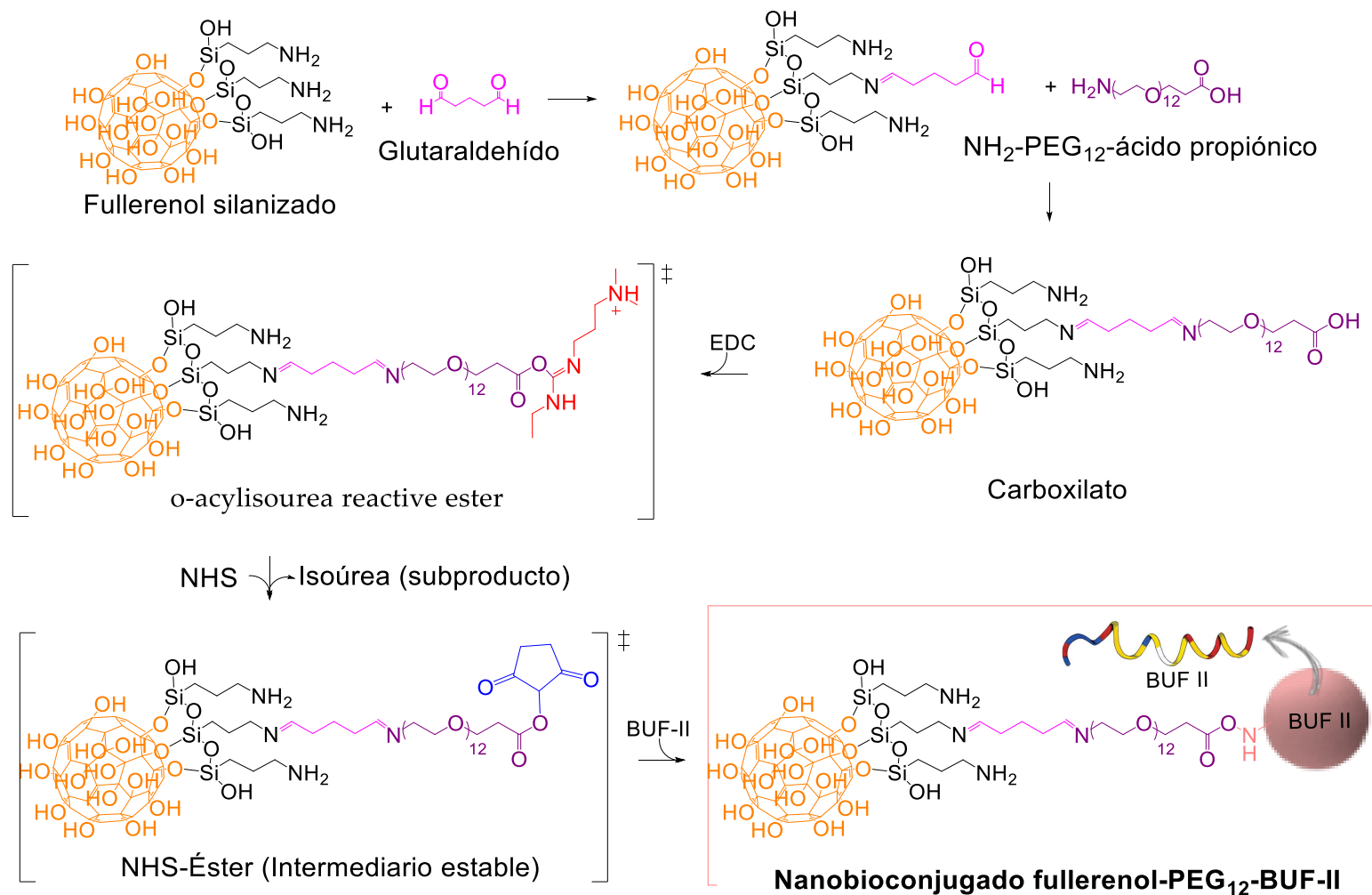


Figura 5-6. Representación esquemática del protocolo seguido para la bioconjugación de BUF-II con el fullerenoil silanizado ⁴⁴

5.4.4 Bioconjugación de OmpA en las NPs de fullereno silanizadas

Para la conjugación de OmpA al fullereno silanizado, se empleó un protocolo similar al descrito en la sección 5.3.4. En la **Figura 5-7** se muestra la reacción general de conjugación OmpA-SNPs junto a una comparación del tamaño de partícula y como contrastan con los tamaños de las biomoléculas.

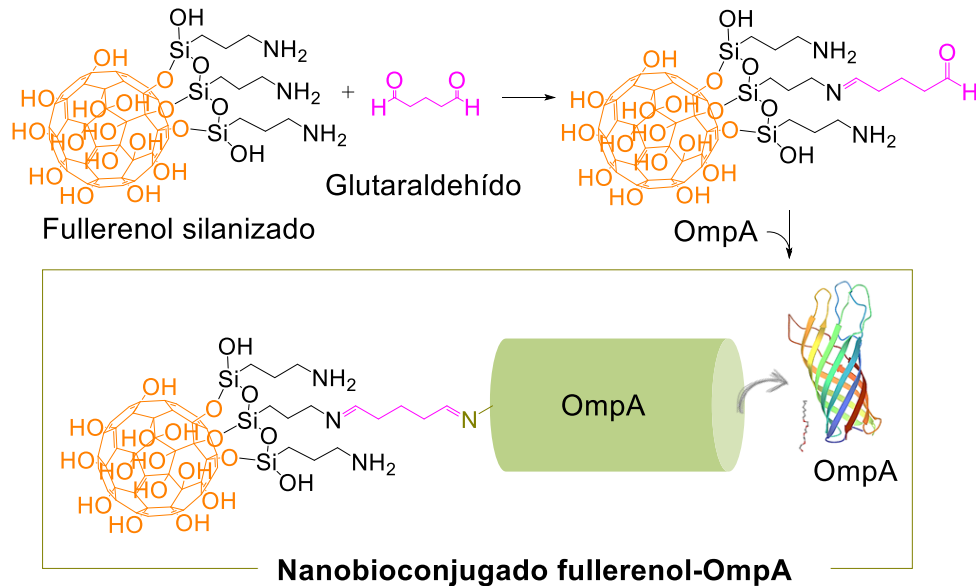


Figura 5-7. Representación esquemática del protocolo seguido para la bioconjugación de OmpA con el fullereno silanizado ^{89,90}.

5.5 Ensayos biológicos

5.5.1 Detección de contaminación bacteriana de los nanobioconjugados en placas de agar

El propósito de este ensayo fue verificar que los nanobioconjugados sintetizados estuviesen libres de contaminación por microorganismos, ya que los ensayos biológicos posteriores así lo requerían. Resumiendo, en placas de LB agar (La composición del LB agar es Triptona 10g/L, Extracto de levadura 5.0g/L, NaCl 0.5g/L, Agar 15 g/L), y bajo condiciones de esterilidad, se sembraron 10µL de las NPs silanizadas y los

nanobioconjugados. Como control negativo de crecimiento microbiano se usó agua estéril. Las placas se incubaron a 37 °C por 72 horas ⁹³.

5.5.2 Biocompatibilidad

Análisis *in vitro* de las propiedades hemolíticas de los nanobioconjugados

La hemólisis es el daño acelerado de las membranas de los eritrocitos, que provoca la liberación del contenido intraeritrocitario (hemoglobina, potasio, Lactato deshidrogenasa y otros componentes) en el plasma sanguíneo. La actividad hemolítica de los nanobioconjugados fue evaluada de acuerdo con el método descrito previamente por Muñoz-Camargo C. *et al.*, ⁹⁴. Resumiendo, se obtuvo sangre humana de donantes sanos en tubos para extracción de sangre por sistema de vacío BD Vacutainer®, con EDTA como suplemento anticoagulante. Para la obtención de los glóbulos rojos, la sangre se centrifugó 1000 rpm por 5 minutos (Micro Centrifuga Z 306, Hermle Labortechnik GmbH), y se marcó el nivel de hematocritos (capa inferior, roja) y plasma (capa superior, amarilla). Se retiró el plasma con una micropipeta, se llenó de nuevo el tubo hasta la marca con NaCl 150 mM, invirtiendo el tubo suavemente para mezclar, y se centrifugó de nuevo (repetiendo el procedimiento tres veces). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con PBS a pH 7,4. El ensayo de hemólisis se realizó en microplacas transparentes de 96 pozos de fondo plano, se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 1 hora, 50 µL de cada concentración de nanobioconjugados (300, 150, 75, 37,5 y 18,75 µg/mL) y 50 µL de glóbulos rojos diluidos. Finalmente, se centrifugó la microplaca, se pasó el sobrenadante de cada pozo a una microplaca nueva y se midió la absorbancia (oxihemoglobina, 450 nm) en un espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Como control positivo se incubaron 50 µL de glóbulos rojos diluidos y 50 µL de Triton X-100 10% (100% hemólisis), y como control negativo se incubaron 50 µL de glóbulos rojos diluidos y 50 µL de PBS 1X (0% hemólisis). El porcentaje de hemólisis se calculó de acuerdo con la **Ecuación 1**:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{Abs_{450nm}(\text{muestra}) - Abs_{450nm}(\text{control } (-))}{Abs_{450nm}(\text{control } (+)) - Abs_{450nm}(\text{control } (-))} * 100\% \quad (1)$$

Evaluación *in vitro* de los efectos de los nanobioconjugados en la agregación plaquetaria

La tendencia de un nanomaterial a causar agregación plaquetaria *in vitro* puede servir como una medida de la probabilidad de que el material sea pro o anticoagulante *in vivo*⁹⁵. El efecto de los nanobioconjugados sobre la agregación plaquetaria se evaluó usando plasma rico en plaquetas (PRP). Resumiendo, se obtuvo sangre humana de donantes sanos en tubos para extracción de sangre por sistema de vacío BD Vacutainer®, anticoagulada con citrato de sodio. Para la obtención del PRP, la sangre se centrifugó 1000 rpm por 15 minutos (Micro Centrifuga Z 360, Hermle Labortechnik GmbH), y se recolectó el PRP en un tubo nuevo. El ensayo de agregación plaquetaria se realizó en microplacas transparentes de 96 pozos de fondo plano, se incubaron durante 15 minutos a 37°C, 100µL de cada concentración de nanobioconjugados (300, 150, 75, 37.5, y 18.75 µg/mL) y 100µL de PRP. Como control positivo se expuso PRP a Trombina (6U), y a PBS 1X como referencia negativa⁹⁶. Finalmente, se midió la absorbancia a 620 nm. El porcentaje de agregación plaquetaria se calculó de acuerdo con la **Ecuación 2**:

$$\% \text{ Agregación plaquetaria} = \frac{Abs_{620nm}(muestra)}{Abs_{620nm}(control (+))} * 100\% \quad (2)$$

Ensayo MTT para monitorear la viabilidad celular

El MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es un colorante amarillo de tetrazolio soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es reducido metabólicamente por las células viables a cristales de formazán, un colorante púrpura insoluble en agua. La reducción de MTT ocurre principalmente en las mitocondrias a través de la acción del succinato deshidrogenasa. La cantidad de formazán se puede determinar solubilizándolo en DMSO y midiéndolo espectrofotométricamente. La comparación entre los resultados obtenidos para células tratadas y no tratadas con los nanobioconjugados proveen un estimado de la citotoxicidad⁹⁷. La viabilidad celular fue evaluada de acuerdo con el método descrito previamente por Muñoz-Camargo C. *et al.*,⁹⁴. Resumiendo, células Vero (ATCC® CCL-81) (adherentes) y THP-1 (ATCC® TIB-202) (no adherentes) se sembraron en microplacas de cultivo de 96 pozos (10000 células/pozo) en medio suplementado (10% FBS) y se incubaron a 37°C, al 5% de CO₂ durante 24h. A continuación, se extrajo el medio de cultivo y se reemplazó con 100 µL de cada concentración de tratamiento (300, 150, 75, 37,5 y 18,75 µg/mL en medio DMEM para células Vero (ATCC® CCL-81) y medio RPMI para THP-1 (ATCC® TIB-202). Posteriormente, se agregó MTT (10µL, 5 mg/mL) y las

células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 2h. Se eliminó el medio y se añadió DMSO (100µL) para diluir los cristales de formazán. Finalmente, se midió la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas Multiskan™ FC (*Thermo Fisher Scientific Inc*, USA) y se comparó con controles (células cultivadas en DMSO). El porcentaje de viabilidad celular se calculó de acuerdo con la **Ecuación 3**:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{Abs_{595nm}(\text{muestra})}{Abs_{595nm}(\text{control})} * 100\% \quad (3)$$

5.5.3 Liberación de los nanobioconjugados en células de mamíferos

Para evaluar la internalización celular y escape endosomal de los nanobioconjugados se empleó microscopia confocal. Las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados se marcaron con la sonda fluorescente Rodamina B usando EDC/NHS para formar enlaces amida entre el grupo carboxilato de la Rodamina B y grupos amina primaria libres de las NPs silanizadas, BUF-II y OmpA. Resumiendo, bajo condiciones de oscuridad se adicionó EDC (15 mg), NHS (7.5 mg), DMF (1 mL) a 5 mL de agua estéril y se agitó por 15 minutos. Posteriormente, se adicionó 2 mg de rodamina B y se agitó 15 minutos a 40 °C. Después, se dejó enfriar y se mezcló con 50 mg de las NPs silanizadas y los nanobioconjugados y se agitó 24 horas a 220 rpm usando un *Shaker*. Finalmente, para remover el exceso de fluoróforo, las NPs se lavaron centrifugando en tubos Eppendorf a 14500 rpm por 20 minutos, usando una Micro Centrifuga Z 216 M (Hermle Labortechnik GmbH). Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y al pellet residual en el tubo se le adicionó agua tipo I (Agua ultrapura con una resistividad >18 MΩ-cm, y conductividad <0.056 µS/cm), se resuspendió y se repitió varias veces más el procedimiento de lavado, centrifugación-resuspensión hasta no observar rodamina B en el sobrenadante. Las NPs marcadas se protegieron de la luz³⁰. Posteriormente, se incubaron células Vero (ATCC® CCL-81) (10⁵ células/placa de vidrio de 35 mm previamente recubierto con Poli-D-Lisina según las instrucciones del fabricante) y se incubaron en DMEM (5% FBS) a 37°C, 5% CO₂ para permitir la adhesión celular. Se expusieron las células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202) a las NPs silanizadas (100µL, 18,75 µg/mL), los nanobioconjugados (100µL, 18,75 µg/mL), 4,6-diamino-2-fenilindol clorhidrato (DAPI) (1µL, medio 1:1000), y *Lysotracker Green DND-26* (0.1µL, medio 1:10000) durante 10 minutos antes de la observación por microscopia confocal³⁰.

5.5.4 Ensayo de actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el ensayo de microdilución en caldo descrito anteriormente por Pérez *et al.*,²⁹. Resumiendo, se cultivaron células bacterianas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *E. coli* en placas de LB agar a 37°C por 18 horas. De las placas de agar se seleccionaron de tres a cinco colonias bien aisladas y se incubaron en caldo fresco a 37 °C hasta alcanzar la turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland (La suspensión resultante contiene aproximadamente 1-2x10⁸ UFC/mL). Una vez que las células bacterianas alcanzaron la fase logarítmica media, las células se centrifugaron, se lavaron tres veces con tampón de fosfato de sodio 10 mM (NaPB, pH 7,4) y se diluyeron hasta una concentración aproximada de 5x10⁵ (UFC/mL) ajustados espectrofotométricamente. Luego, en microplacas transparentes de 96 pozos de fondo plano se agregaron 50 µL de las células diluidas a 50 µL de cada concentración de nanobioconjugados (300, 150, 75, 37,5 y 18,75 µg/mL) y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de medio LB fresco a cada pozo y se incubaron durante 18 horas a 37°C. Los efectos inhibidores del crecimiento se evaluaron midiendo la D.O. a 620nm en un espectrofotómetro lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la **Ecuación 4**, donde D.O. (muestra) es el valor de densidad óptica a 620 nm de los pozos con nanobioconjugados en presencia de bacterias y medio; D.O. (blanco) es la densidad óptica a 620 nm de los pozos con medio de cultivo (sin bacterias); y D.O. (control) es el valor de densidad óptica a 620 nm de los pozos con el medio más bacterias:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{D.O._{620nm}(\text{muestra}) - D.O._{620nm}(\text{blanco})}{D.O._{620nm}(\text{control})} * 100\% \quad (4)$$

5.5.5 Análisis estadístico

En los ensayos de viabilidad celular, hemólisis, agregación plaquetaria, y actividad antibacteriana los valores son expresados como el promedio ± Desviaciones estándar (SDs) de triplicados. En los ensayos de colocalización, la significancia estadística de los datos fue evaluada mediante ANOVA de una vía (datos no paramétricos, ensayo de Kruskal-Wallis y un ensayo de comparaciones múltiples de Dunn), usando el software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los valores fueron considerados estadísticamente significativos a los niveles P<0.05 (*), P<0.001 (***), P<0.0001 (****).

6. Resultados y discusión

6.1 Caracterización fisicoquímica de los nanobioconjugados basados en SNPs

La **Figura 6-1** muestra un esquema de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados obtenidos después de todos los pasos de funcionalización.

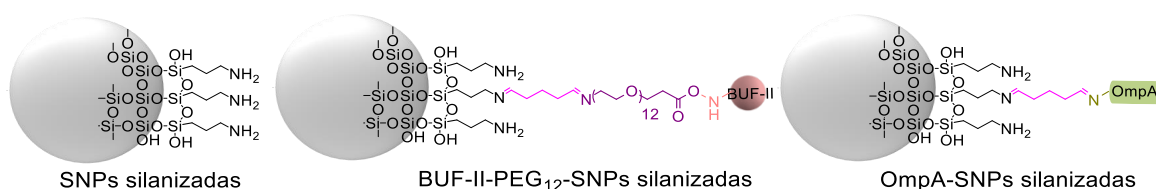


Figura 6-1. Esquema de la estructura química de las SNPs silanizadas y los bionanoconjugados.

En el espectro UV-vis de las SNPs desnudas y de las SNPs silanizadas se observan bandas con longitudes de onda de máxima absorción en 250 nm y 275 nm características de las SNPs. En las SNPs silanizadas bandas alrededor de 210 nm que no se observa en las SNPs sin funcionalizar, probablemente se deba a la presencia de los grupos propilamina (**Figura 6-2**)^{98,99}.

El patrón de difracción de rayos X de las SNPs y SNPs silanizadas muestran una banda ancha en 2θ alrededor de 26° , característica de las SNPs (**Figura 6-3**)¹⁰⁰. Además la falta de periodicidad reflejada en esta ausencia de máximos agudos sugiere una estructura amorfa^{101,102}.

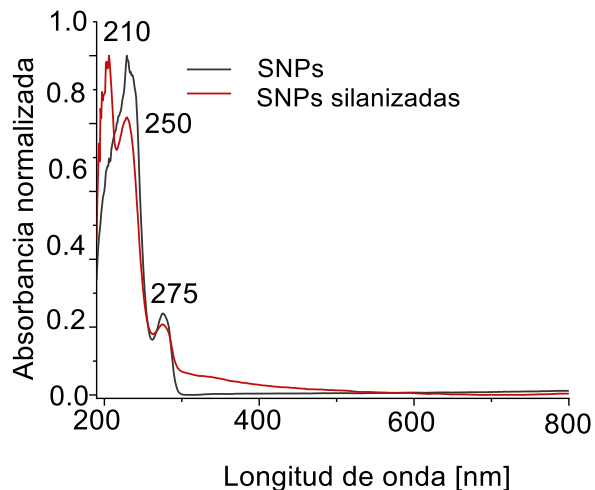


Figura 6-2. Espectro UV-vis de las SNPs desnudas y de las SNPs silanizadas ⁹⁸.

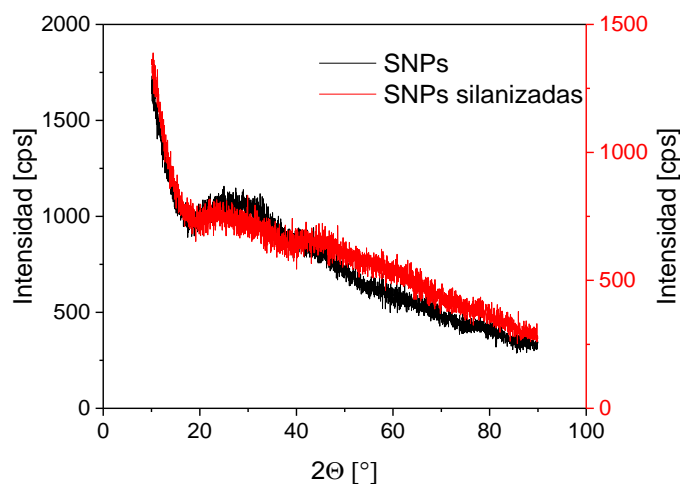


Figura 6-3. Difractogramas de rayos X de las SNPs y SNPs silanizadas.

La **Figura 6-4** muestra el espectro infrarrojo de SNPs desnudas, SNPs silanizadas, OmpA libre, BUF-II libre, y los nanobioconjugados basados en SNPs. Las SNPs desnudas muestran bandas de absorción características en el infrarrojo en 1100 cm^{-1} (Si-O s as), 970 cm^{-1} (Si-OH s as), y 801 cm^{-1} (Si-O s sy) ¹⁰³. En las SNPs silanizadas se observan nuevas bandas en 2925 cm^{-1} (C-H s as), 2852 cm^{-1} (C-H s sy), 1639 cm^{-1} (N-H d) y 1383 cm^{-1} (C-N s) que evidencian la presencia de grupos propilamina en la superficie de las SNPs ⁸⁶; estas bandas también se observan en los nanobioconjugados. En BUF-II libre y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs, se observan nuevas señales debidas a los

modos vibracionales Amida I y Amida II además de diferentes señales propias del péptido que no se observan en las SNPs sin funcionalizar. El modo amida I, entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, se debe principalmente a las vibraciones de tensión $\text{C}=\text{O}$, más las vibraciones de flexión fuera del plano de CN y CCN , y en menor proporción a la flexión el plano del N-H . El modo amida II, entre $1570\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$, es debida a la flexión en el plano del NH , junto la vibración de tensión del CN y otras contribuciones del grupo amida ^{28,29,104}. Las señales de los entrecruzantes (PEG y glutaraldehído) se superponen con las fuertes señales de las SNPs silanizadas y las señales del péptido ^{103,105,106}

Tabla 6-1. Descripción de varios modos vibracionales de amidas en péptidos y proteínas

Modo amida	Rango número de onda [cm^{-1}]	Contribuciones aproximada de los enlaces químicos individuales (%)
Amida I	1700-1600	CO s (76), CN s (11), CCN d (8), NH ib (5)
Amida II	1570-1540	NH ib (45), CN s (30), CO ib (10) CC s (8), NC s (7)
Amida III	~1250	NH ib (50), CC s (20), CN s (18), CO ib (12)

s, stretching; d, deformation; ib, in-plane bending; ob

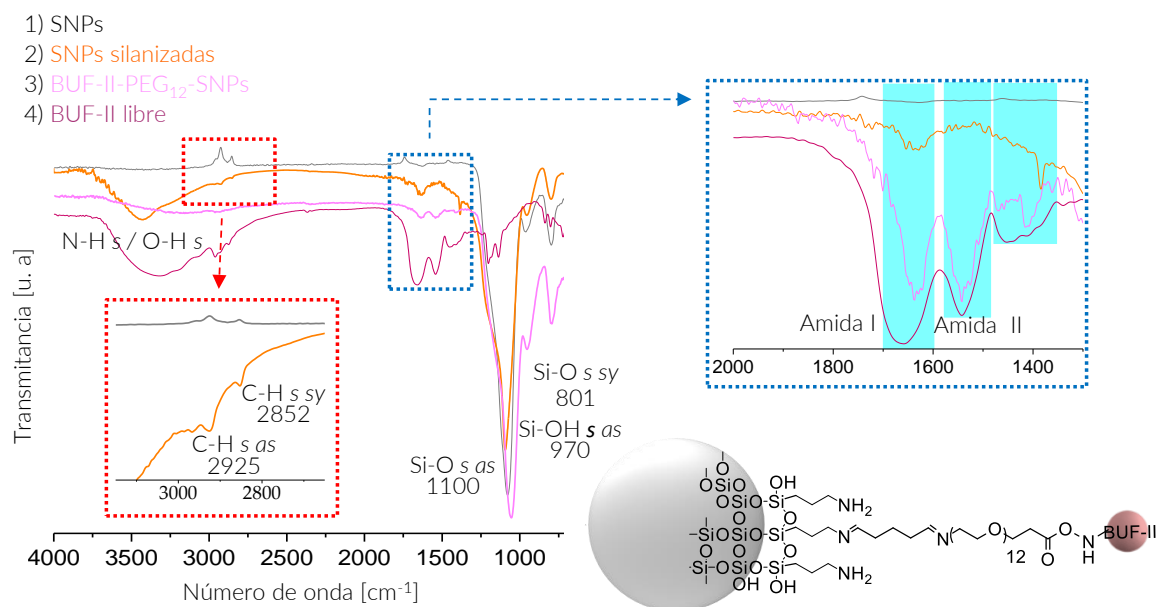


Figura 6-4. Espectros FTIR de (1) SNPs desnudas, (2) SNPs silanizadas, (3) BUF-II-PEG₁₂-SNPs, (4) BUF-II libre.

En la OmpA libre y los nanobioconjugados OmpA-SNPs, la presencia de los modos vibracionales amida I y amida II no observados en las SNPs sin funcionalizar, sugieren la

correcta conjugación de la proteína OmpA en las SNPs silanizadas ^{30,103,107}. Las señales del entrecruzante (glutaraldehído) se superponen con las fuertes señales de las SNPs silanizadas y las señales de la proteína (**Figura 6-5**) ^{103,106}

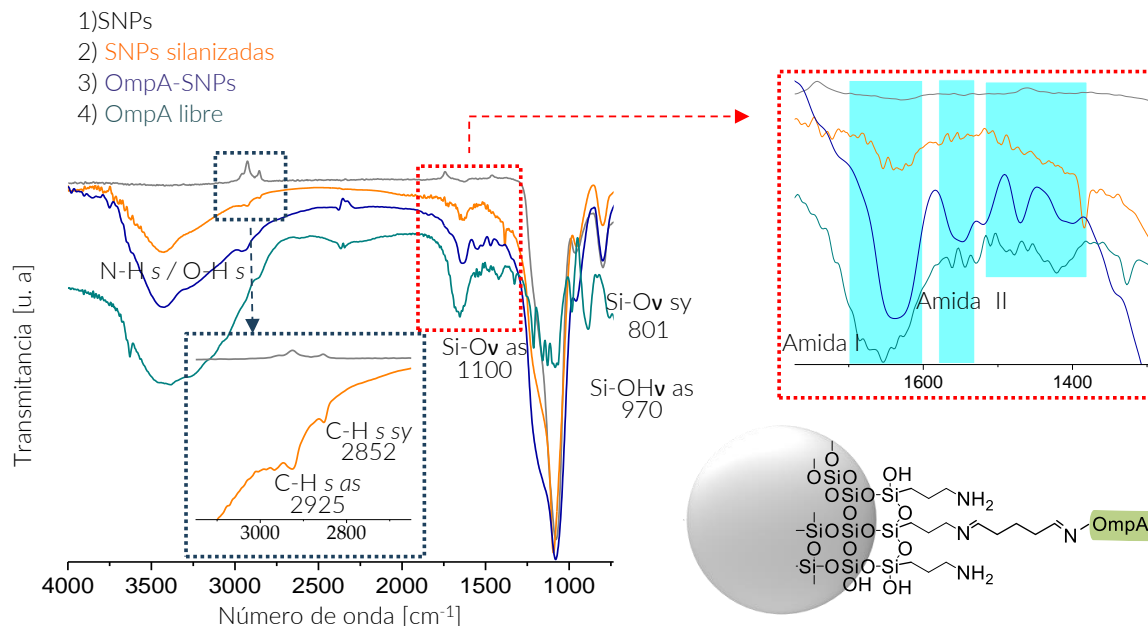


Figura 6-5. Espectros FTIR de (1) SNPs desnudas, (2) SNPs silanizadas, (3) OmpA-SNPs, (4) OmpA libre.

La **Figura 6-6** muestra la distribución de tamaño de partícula por intensidad. Las SNPs desnudas se obtuvieron con un diámetro hidrodinámico promedio de 41,3 nm y un índice de polidispersidad de 0,11. El tamaño y la polidispersidad de las SNPs sintetizadas por este método están determinados principalmente por el tipo de alcohol empleado en la síntesis (*i.e.*, las soluciones de metanol dan como resultado partículas de tamaño más pequeño y distribuciones de tamaño más estrechas, mientras que al aumentar la longitud de la cadena del alcohol tanto el tamaño de partícula como la polidispersidad aumentan (ver **anexo B**)), la concentración de los precursores (principalmente la concentración de amoníaco), y la temperatura de reacción (que influye en la velocidad de nucleación y crecimiento de las SNPs) ^{17,108,109}. En el procedimiento de silanización, al introducir un 5% de APTES por un 95% de TEOS se obtuvieron dos poblaciones de partículas con diámetros hidrodinámicos alrededor de 40 y 220 nm (diámetro hidrodinámico promedio: 176,1 nm, índice de polidispersidad: 0,19). En este sentido, Li *et.al.*; demostraron que el número total de SNPs internalizadas en células Hela era mayor en coexposiciones de

SNPs grandes y pequeñas (50 y 100 nm) que en exposiciones simples de las mismas ¹¹⁰. También se puede observar que el diámetro hidrodinámico promedio de las partículas aumentó después de la conjugación del péptido y la proteína, a 212 nm para BUF-II-PEG₁₂-SNPs y 230 nm para OmpA-SNPs. En cuanto al tamaño, no existe consenso sobre un tamaño óptimo que maximice la internalización celular manteniendo la viabilidad celular; y varias investigaciones experimentales sugieren que tamaños de partícula reducidos no necesariamente favorecen la translocación de la membrana celular. Sin embargo, los nanotransportadores basados en NPs en el rango de tamaño de 10 a 200 nm se utilizan comúnmente para facilitar la entrega de cargos a nivel celular y además no son fácilmente excretados a través de cualquiera de los sistemas fisiológicos destinados para ello, y por lo tanto alcanzan los órganos y tejidos blanco en concentraciones suficientemente altas ^{12,111,112}.

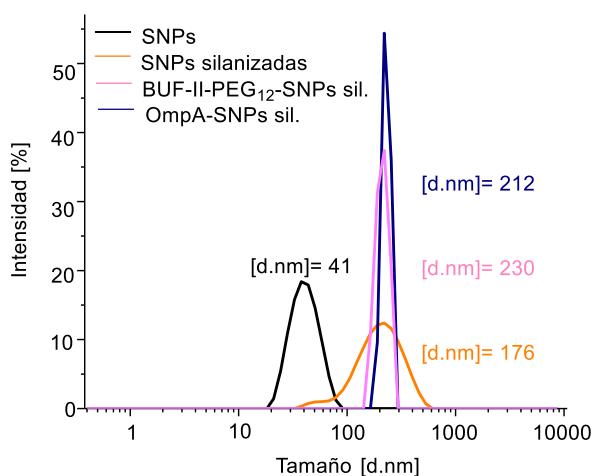


Figura 6-6. Distribución de tamaño por intensidad de las SNPs desnudas, SNPs silanizadas y los nanobioconjugados determinados por DLS.

Adicionalmente, el potencial ζ es un indicativo de la estabilidad de la suspensión, si todas las partículas en suspensión tienen un alto potencial ζ (bien sea negativo o positivo), estas tienden a repelerse entre sí y no habrá tendencia a flocular. Las partículas con potenciales ζ más positivos que + 25 mV o más negativos que -25 mV se consideran normalmente estables ¹¹³. Las mediciones de potencial ζ de las SNPs obtenidas en este trabajo indican que en medio acuoso estas adquieren una carga superficial negativa de -37.6 ± 4.91 mV; este valor es indicativo de su buena estabilidad en agua. En las SNPs silanizadas, el potencial ζ varió a $4,41 \pm 3,27$ mV, indicativo de una menor estabilidad en medio acuoso.

Los valores de potencial ζ para los nanobioconjugados BUF-PEG₁₂-SNPs y OMPA-SNPs fueron $7,34 \pm 3,36$ mV y $18,1 \pm 5,13$ mV, respectivamente; por lo que estos nanobioconjugados a pH biológico tienden a precipitar.

Mediante análisis termogravimétrico (TGA) se estimó la cantidad de material conjugado a las SNPs (**Figura 6-7**).

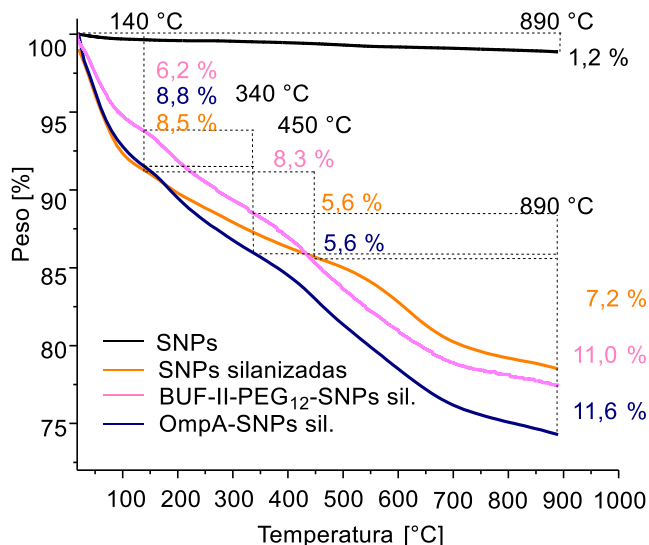


Figura 6-7. Termogramas de las SNPs, SNPs silanizadas y los nanobioconjugados.

Las SNPs desnudas muestran una alta estabilidad térmica, tan solo pierden el 1,2% del peso después de calentarse desde temperatura ambiente hasta 890°C. En contraste, las SNPs silanizadas, y los nanobioconjugados pierden peso en tres rangos de temperatura: temperatura ambiente a 140°C, 140°C-450°C y >450° para las SNPs silanizadas, 140°C-340°C, y >340° para los nanobioconjugados. Las SNPs silanizadas, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, y OmpA-SNPs presentaron una primera pérdida de peso de 8,5%, 8,8% y 6,2% debida principalmente a la pérdida de agua superficial. Se observa una segunda pérdida de peso de 5,6% para las SNPs silanizadas y OmpA-SNPs, mientras que para BUF-II-PEG₁₂-SNPs fue de 8,3%. Estas pérdidas se atribuyen a grupos etoxi no hidrolizados del APTES, alcohol y amoniaco residuales de la síntesis y la funcionalización ¹¹⁴. Las pérdidas de peso a las temperaturas más altas pueden atribuirse a la pérdida de grupos aminopropil (7,2%) para las SNPs silanizadas, y al desprendimiento de la BUF-II (3,8%) y OmpA (4,4%) en los nanobioconjugados. Los rangos se definieron con base en las primeras derivadas.

Las imágenes SEM y TEM de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados confirmaron los datos obtenidos por DLS en cuanto al tamaño y polidispersidad de las NPs, además se puede observar que estas presentan principalmente morfología esférica. Aparentemente la rugosidad de las partículas cambia posterior a la funcionalización, esto también podría tener incidencia en su interacción con las células¹¹⁵ y la capacidad de carga¹¹⁶ de estos materiales (**Figura 6-8**).

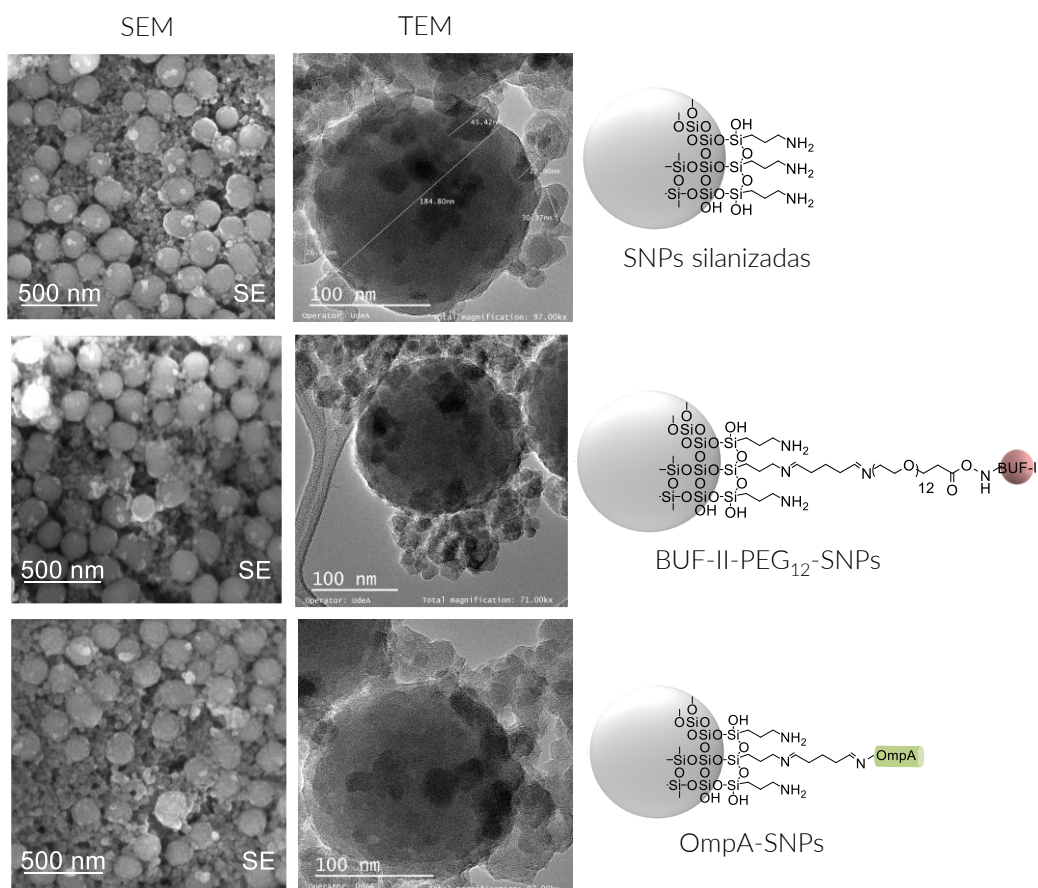


Figura 6-8. Micrografías electrónicas de barrido y transmisión de las SNPs silanizadas, Nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y Nanobioconjugados OMPA-SNPs.

Siendo conscientes de que se requiere una gran cantidad de conceptos y técnicas para comprender la estructura y propiedades de este tipo de nanomateriales, se intentó realizar espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La técnica de RMN se pueden aplicar a biomoléculas pequeñas o grandes y podrían permitir la identificación de estas biomoléculas conjugadas a las NPs. Adicionalmente, una secuencia de pulsos basada en

la aplicación de gradientes de campo conocida como espectroscopia de difusión ordenada (*diffusion-ordered spectroscopy*, DOSY) ofrece la posibilidad de distinguir entre las biomoléculas libres o unidas a las partículas ¹¹⁷. Sin embargo, se presentaron problemas de solubilidad y estabilidad de los nanobioconjugados en los solventes deuterados (DMSO-d₆ y D₂O) en las concentraciones evaluadas, las cuales fueron alrededor de 10-20 mg de nanomateriales en 0,6-0,7 mL de solvente para un tubo de RMN de 5 mm de diámetro (ver **anexo D-1**). Adicionalmente, limitaciones instrumentales también afectaron la obtención de buenos resultados (los análisis se realizaron en espectrómetro Spinsolve de 43 MHz; este equipo es considerado de baja sensibilidad en comparación con los sistemas empleados comúnmente de 400 MHz). Debido probablemente a los problemas antes mencionados, no se observaron las señales correspondientes a los protones de las moléculas de interés, únicamente señales debidas a los solventes (ver **anexos D-2 y D-3**).

6.2 Ensayos biológicos de los nanobioconjugados basados en SNPs

6.2.1 Detección de contaminación bacteriana en los nanobioconjugados basados en SNPs mediante placas de agar

Se realizó un ensayo de detección de contaminación microbiana de los nanobioconjugados basados en SNPs, sobre placas de medio de cultivo LB-agar (**Figura 6-9**). Ni en el control negativo, ni en los nanobioconjugados se observaron unidades formadoras de colonias. Los resultados evidencian la efectividad de las condiciones de esterilidad mantenidas durante el proceso de síntesis y funcionalización de las SNPs, evitando así, eventos de contaminación cruzada en los posteriores ensayos biológicos ¹¹⁸.

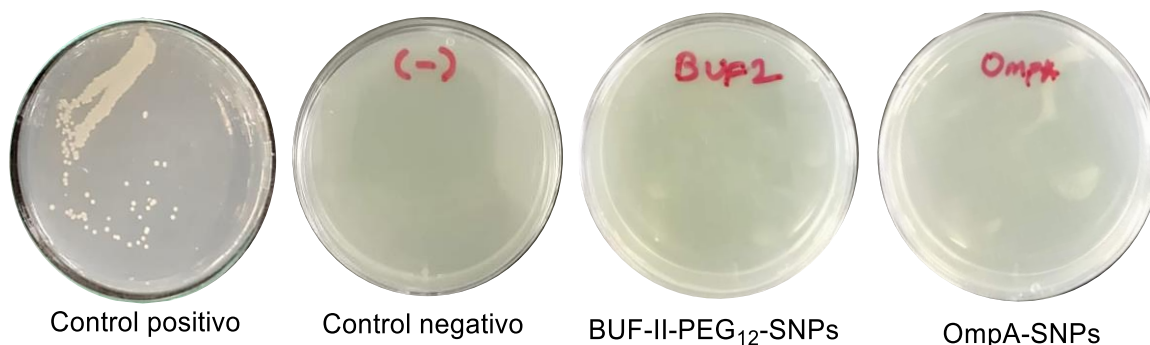


Figura 6-9. Detección de contaminación bacteriana mediante placas de agar.

6.2.2 Biocompatibilidad de los nanobioconjugados basados en SNPs

Un material biocompatible se define como aquel que no puede desencadenar una respuesta no deseada del organismo ¹¹⁹. Según normas como la serie ISO 10993 y la ASTM F1903, para garantizar la biocompatibilidad de los nanomateriales se requieren varias pruebas, entre ellas las de hemocompatibilidad y citotoxicidad. En este trabajo se evaluaron las propiedades hemolíticas *in vitro*, así como los efectos sobre la coagulación sanguínea *in vitro* en un ensayo de agregación plaquetaria. De la misma forma, se evaluó la citotoxicidad de los nanobioconjugados (**Figura 6-10**).

La **Figura 6-10a** muestra la viabilidad celular en las células THP-1 (ATCC® TIB-202) y Vero (ATCC® CCL-81) tras 24 y 48 horas de exposición a los tratamientos, respectivamente. Los resultados mostraron un perfil de viabilidad dependiente de la concentración en ambas líneas celulares y en todos los tratamientos probados. Así, a dosis bajas (18 y 37 $\mu\text{g/mL}$) de los tratamientos, la viabilidad celular no se redujo significativamente en ninguna de las dos líneas celulares. Además, los nanobioconjugados OmpA-SNPs resultaron menos citotóxicos que los de BUF-II-PEG₁₂-SNPs, ya que la viabilidad fue superior al 70% a concentraciones de hasta 75 $\mu\text{g/mL}$ de nanobioconjugados OmpA-SNPs, mientras que, a la misma concentración las células tratadas con nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs mostraron una disminución de la viabilidad en ambas líneas celulares ¹²⁰. En todos los casos, los nanobioconjugados fueron menos citotóxicos que las SNPs silanizadas. La **Figura 6-10b** muestra la evaluación *in vitro* de la hemocompatibilidad. No hubo ningún efecto hemolítico significativo inducido por las SNPs silanizadas o los nanobioconjugados, los valores de hemólisis se mantuvieron por debajo del 3% ¹²¹. Los tratamientos revelaron valores de agregación plaquetaria entre el 2-16% por encima del control negativo. Valores superiores al 20% indicarían agregación plaquetaria significativa ⁹⁵.

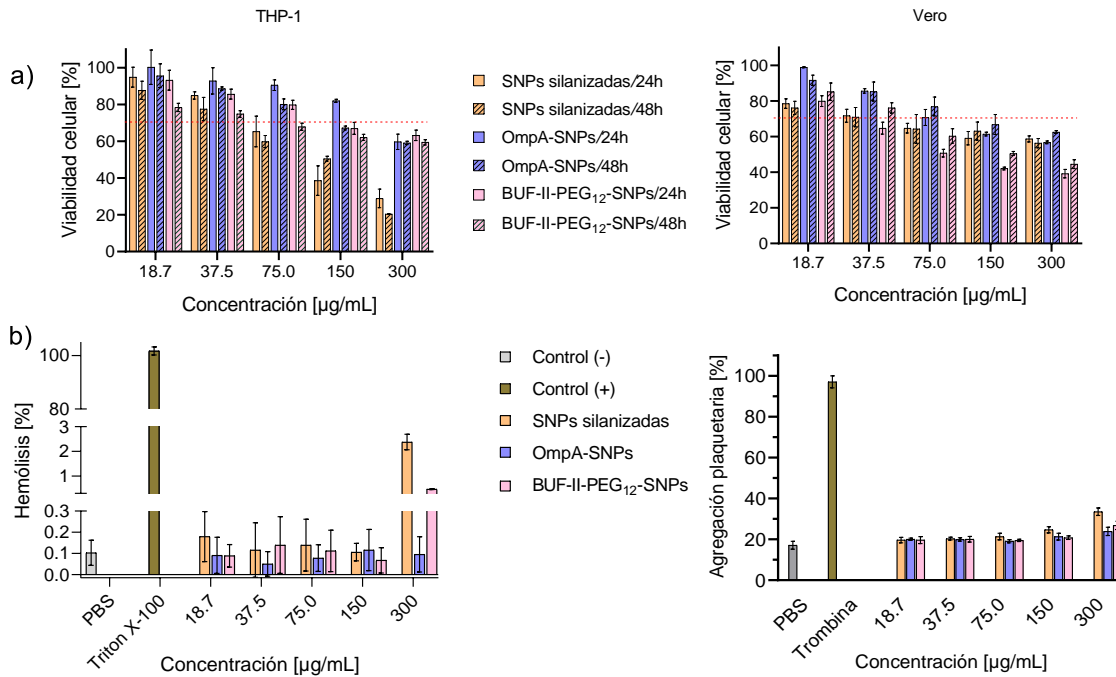


Figura 6-10. a) Evaluación de la citotoxicidad de los nanobioconjugados mediante ensayos de MTT después de 24 y 48 horas de exposición a los tratamientos. b) Evaluación *in vitro* de la hemocompatibilidad. Evaluación del efecto hemolítico de los nanobioconjugados (Control positivo: Tritón X-100, control negativo: PBS; y evaluación *in vitro* de agregación plaquetaria (Control positivo: Trombina, control negativo: PBS).

6.2.3 Actividad antimicrobiana de los nanobioconjugados basados en SNPs

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs contra *S. aureus* y *E. coli* (Figura 6-11). Las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* en función de la concentración de las partículas y con mayor efecto en los nanobioconjugados que tienen inmovilizado el péptido antimicrobiano Buforina II. Sin embargo, en las concentraciones analizadas, la inhibición del crecimiento bacteriano no es suficiente para considerar estos materiales como potenciales agentes antibacterianos.

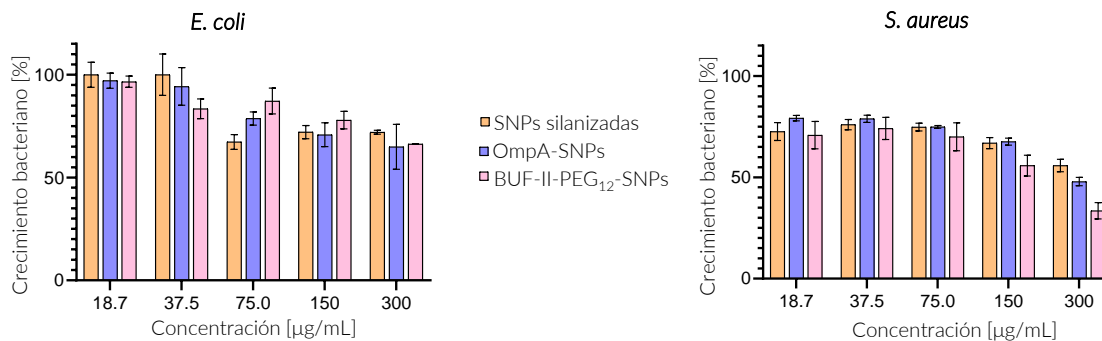


Figura 6-11. Actividad antibacteriana de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs contra *S. aureus* y *E. coli*.

6.2.4 Translocación y escape endosomal de los nanobioconjugados basados en SNPs

Las Figuras 6-12 y 6-13 evidencian la internalización de las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs por las células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202) después de 30 minutos y 4 horas; corresponden a una muestra de las diferentes imágenes analizadas (**ver sección 5.2**). Primero se muestra la superposición de todos los canales evidenciando la morfología e integridad celular. Luego en vistas ampliadas de los recuadros, se muestran los núcleos marcados con DAPI (azul), los endosomas marcados con *Lysotracker green* (verde) y los nanobioconjugados marcados con rodamina B (rojo). Los nanobioconjugados (rojo) se visualizaron distribuidos de forma homogénea en el interior de las células sin alcanzar significativamente el núcleo (azul). En la superposición de los tres canales, las áreas de color “amarillo”² evidencian de forma visual y cualitativa la colocalización de los endosomas y los nanobioconjugados.

² No siempre que haya colocalización se observa un color amarillo, depende de la intensidad de las señales de los canales rojo y verde.

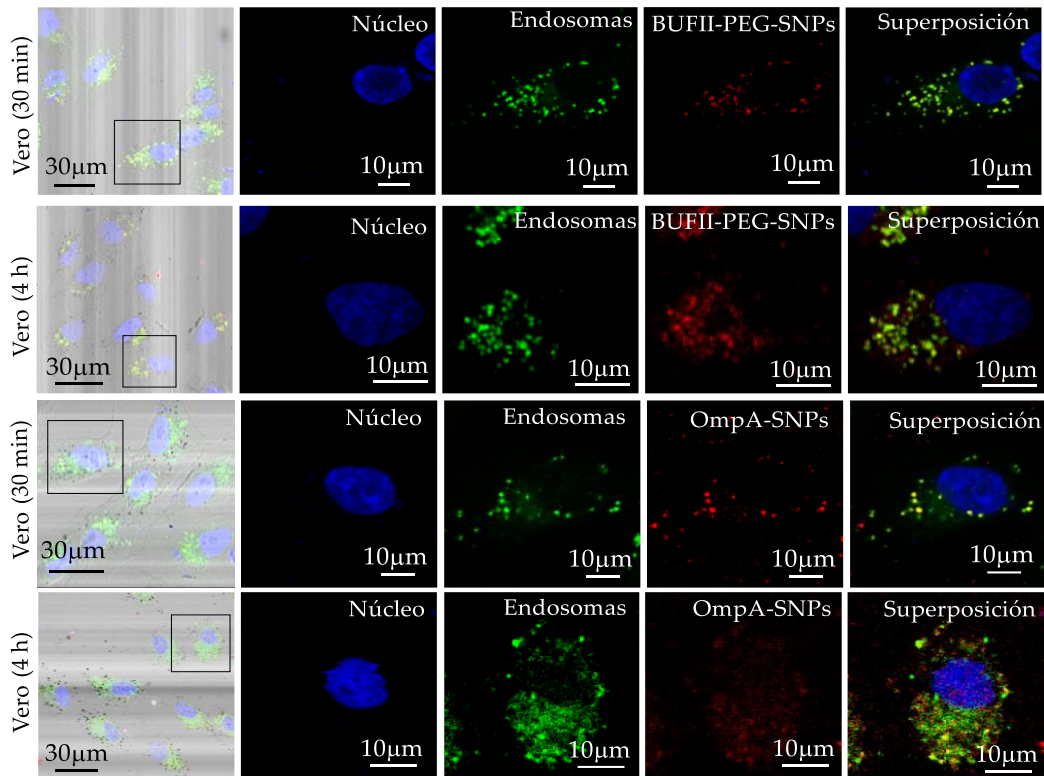


Figura 6-12. Imágenes de microscopía confocal de células Vero (ATCC® CCL-81), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs durante 30 minutos y 4 horas.

Adicionalmente, la colocalización de los nanobioconjugados con organelos ácidos (endosomas/lisosomas) se determinó cuantitativamente mediante un análisis de correlación basado en el coeficiente de correlación de Pearson (CCP); esto con el objetivo de estimar el escape de los nanobioconjugados de la ruta endosomal. El valor de CCP puede variar de 1 a -1, donde 1 indica una correlación completa y positiva entre las intensidades de las señales de fluorescencia de los canales comparados, -1 una correlación perfecta pero negativa, y 0 ninguna correlación^{122,123}. También se determinó el porcentaje de área cubierta por los nanobioconjugados dentro de las regiones de interés biológico seleccionadas (**Figuras 6-14 y 6-15**).

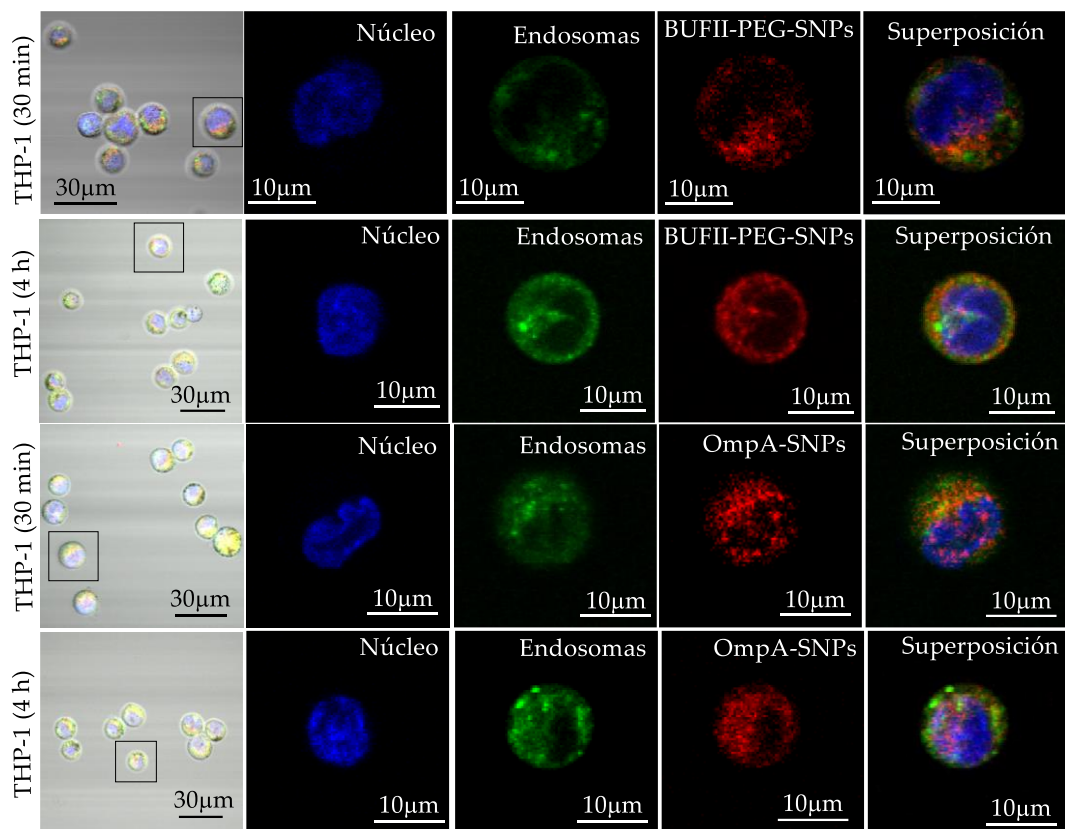


Figura 6-13. Imágenes de microscopía confocal de células THP-1 (ATCC® TIB-202), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs durante 30 minutos y 4 horas.

En la **Figura 6-14a** se muestran los valores de CCP de $0,76 \pm 0,07$; $0,71 \pm 0,10$; y $0,66 \pm 0,10$ para las SNPs silanizadas, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, y OmpA-SNPs, respectivamente, después de 30 minutos en las células Vero (ATCC® CCL-81).

Estos valores de CCP disminuyeron a $0,72 \pm 0,09$; $0,55 \pm 0,12$; $0,54 \pm 0,13$; para las SNPs silanizadas, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, y OmpA-SNPs, respectivamente, después de 4 horas. Esto indica una tendencia de los nanobioconjugados a escapar de los endosomas. En los nanobioconjugados se observó además un aumento del área citoplasmática cubierta (**Figura 6-14b**), por lo que es probable que una fracción de ellos haya ingresado a las células Vero (ATCC® CCL-81) a través de mecanismos diferentes a la endocitosis. Esto muy seguramente se encuentre relacionado a la presencia de los agentes translocantes, teniendo en cuenta además la menor área cubierta por los nanomateriales sin funcionalizar.

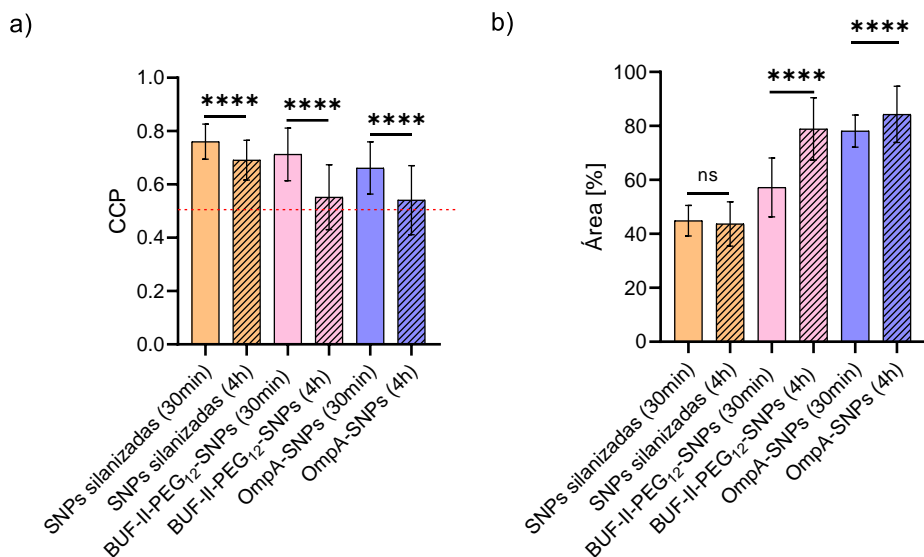


Figura 6-14. CCP para la colocación de los nanobioconjugados y organelos ácidos (lisosomas/endosomas).³ b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados distribuidas en el espacio intracelular, tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas.⁴

Para las células THP-1 (ATCC® TIB-202), los valores de CCP fueron de $0,76\pm 0,07$; $0,70\pm 0,06$; y $0,90\pm 0,05$ para las SNPs silanizadas, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, y OmpA-SNPs, respectivamente, después de 30 minutos. Estos valores de CCP variaron a $0,69\pm 0,77$; $0,78\pm 0,06$; $0,91\pm 0,05$; para las SNPs silanizadas, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, y OmpA-SNPs, respectivamente, después de 4 horas; indicando una baja tendencia de los nanobioconjugados a escapar de los endosomas en las células THP-1 (ATCC® TIB-202) (**Figura 6-15a**). Este comportamiento también puede ser interesante para la exploración de terapias para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal en los cuales se requiere que una vez internalizado por la célula, el tratamiento sea dirigido a los lisosomas¹³. Finalmente, los porcentajes de área citoplasmática cubierta por los nanobioconjugados fueron mayores en las células THP-1 (ATCC® TIB-202) que en las células Vero (ATCC® CCL-81) y continuaron aumentando con el tiempo (**Figura 6-15b**).

³ Los valores de CCP >0.5 (línea punteada) indican una alta probabilidad de que los pixeles de ambos canales estén colocalizados.

⁴ En las gráficas, el término "ns" significa diferencia no significativa, y el número de asteriscos indica el grado de diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos (Ver sección 5.7.5).

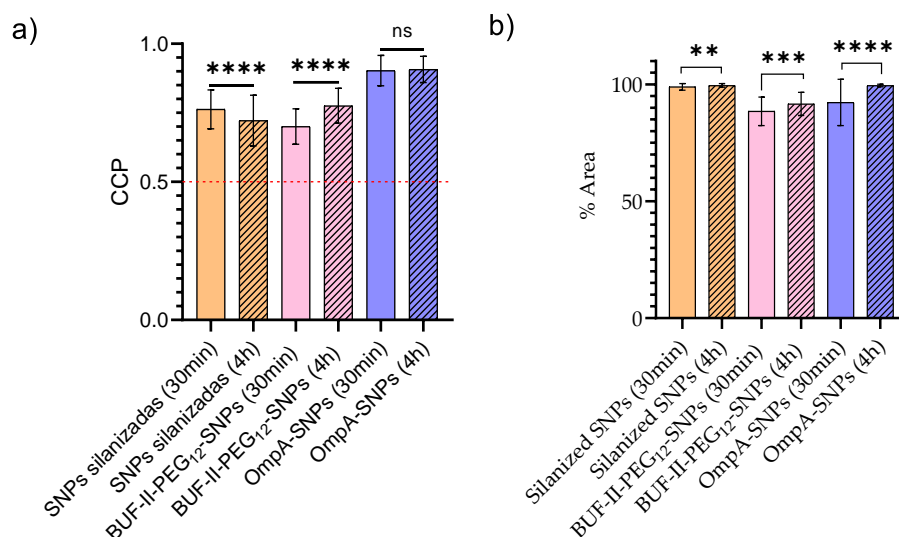


Figura 6-15. a) CCP para la colocalización de BUF-II-PEG₁₂-SNPs, OmpA-SNPs y organelos ácidos (lisosomas/endosomas) tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas.⁵ b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs y OmpA-SNPs distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas.⁶

6.3 Síntesis de fullereno

Debido a que el fullereno C₆₀ es insoluble en agua, este fue solubilizado en tolueno. Después, se puso esta solución en contacto con la solución acuosa de H₂O₂, dando lugar de esta manera a la formación de dos fases líquidas inmiscibles. El TBAH es fundamental como un catalizador de transferencia de fase mediando la interacción entre los iones hidropéroxido (·OOH) en la fase acuosa, generados a partir del H₂O₂ y las moléculas de fullereno hidrofóbicas en la fase orgánica. Una vez la reacción ocurre, la fase orgánica se torna de púrpura a incolora y al dejar en reposo por 15 minutos, se separa una fase acuosa

⁵ Los valores de CCP >0.5 (línea punteada) indican una alta probabilidad de que los píxeles de ambos canales estén colocalizados.

⁶ En las gráficas, el término "ns" significa diferencia no significativa, y el número de asteriscos indica el grado de diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos (Ver sección 5.7.5).

de color anaranjado, la cual contiene el fullereno junto con residuos del catalizador (**Figura 6-16**).

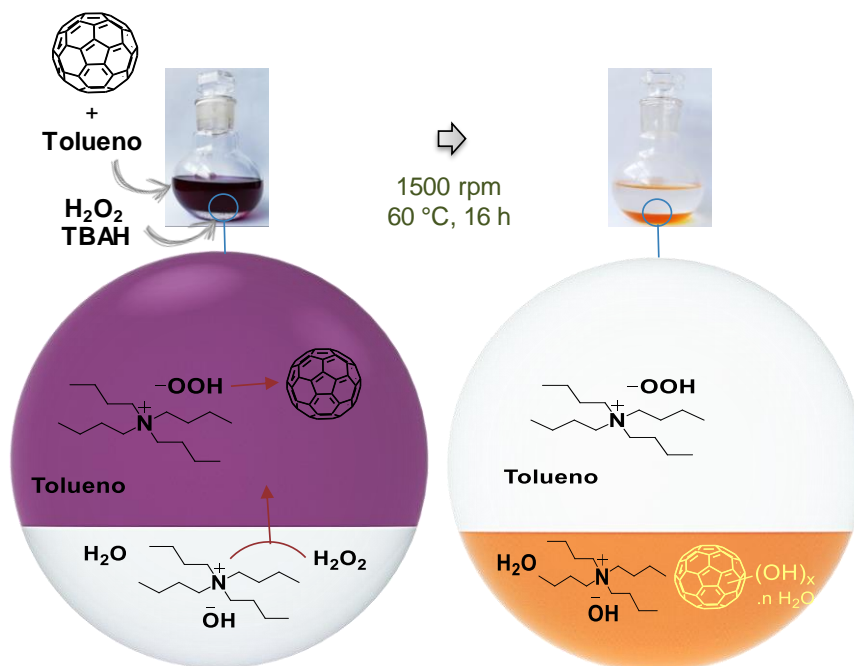


Figura 6-16. Síntesis de fullerol reacción mediante reacción de un solo paso a partir de fullereno C_{60} por hidroxilación con H_2O_2 en presencia de TBAH, en condiciones de bicapa orgánica/acuosa ⁶⁴.

El posible mecanismo reportado para esta reacción, implica el ataque del ion $\cdot OOH$ al fullereno C_{60} formando el epóxido, se repite el ataque del $\cdot O-H$ (o $\cdot OOH$) al epóxido por una reacción de adición nucleofílica formando el fullerol (**Figura 6-17**) ⁶⁴.

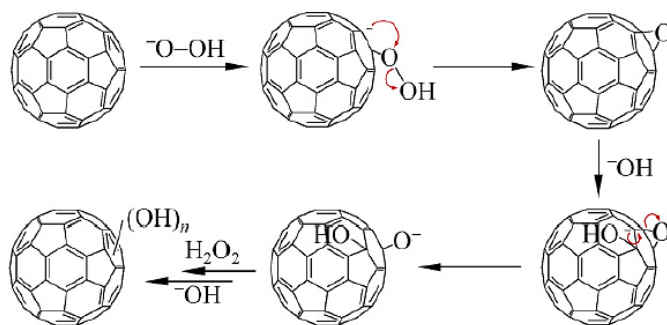
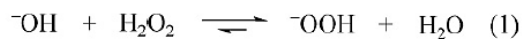


Figura 6-17. Posible mecanismo de reacción para la formación de fullerenoles ⁶⁴

6.4 Caracterización fisicoquímica de los nanobioconjugados basados en fullereno

El fullereno C₆₀ disuelto en tolueno tiene una coloración púrpura y bandas de absorción en el UV-visible características entre 200 nm y 410 nm con longitudes de onda de máxima absorción en 283 nm, 335 nm, y 408 nm, seguidos por una banda ancha de absorción en el rango de 430 nm a 650 nm ¹²⁴. El fullereno disuelto en agua tiene una coloración amarilla y es prácticamente transparente en la región visible, debido a su considerable disminución de los enlaces π-conjugados, comparados al fullereno C₆₀ (**Figura 6-18**).

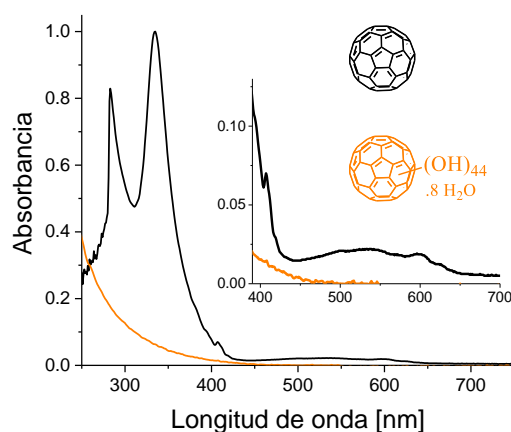


Figura 6-18. Espectro UV-vis de fullereno C₆₀ en tolueno y solución acuosa del fullereno sintetizado.

El fullereno C₆₀ tiene cuatro bandas de absorción de alta intensidad características en el infrarrojo en 1429 cm⁻¹, 1182 cm⁻¹, 573 cm⁻¹, y 525 cm⁻¹ debido a los enlaces C-C (**Figura 6-19 (1)**) ¹²⁵. En el fullereno sin purificar, las dos bandas observadas en 2800–3000 cm⁻¹, y la banda aguda alrededor de 1460 cm⁻¹, son atribuidos al TBAH residual (**Figura 6-19 (2)**); estas señales ya no se observan en el fullereno purificado. El fullereno purificado muestra una banda ancha en 3394 cm⁻¹ que corresponde a la vibración de tensión (s) del enlace O-H y cuatro bandas características en 1630 cm⁻¹ (C=C s), 1390 cm⁻¹ que corresponde a la vibración de deformación (d) del enlace O-H, 1360 cm⁻¹ (C-O-H d), y 1099 cm⁻¹ (C-O s), las cuales están de acuerdo con reportes previos para el fullereno (**Figura 6-19 (3)**) ⁶⁴.

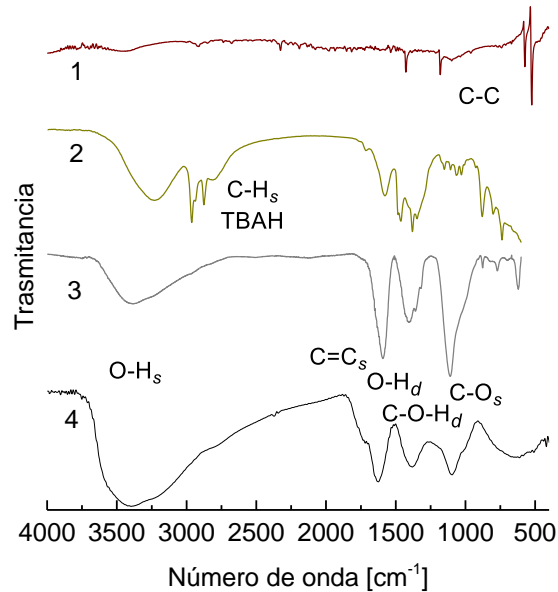


Figura 6-19. Espectros FTIR de (1) fullereno C_{60} , (2) fullerenol sin purificar (con TBAH residual) (3) fullerenol purificado por cromatografía de columna, (4) fullerenol purificado por diálisis.

La **Figura 6-20** muestra el espectro infrarrojo de (1) fullerenol, (2) fullerenol silanizado. En el fullerenol silanizado se observan nuevas bandas, que no se observan en el fullerenol sin funcionalizar, en 2964 cm^{-1} (C-H s as), 2934 cm^{-1} (C-H s sy), 2875 cm^{-1} (H-C(-N) s), 1564 cm^{-1} (N-H d), 1470 cm^{-1} (CH_2 d) y 1220 cm^{-1} que evidencian la presencia de grupos propilamina en el fullerenol silanizado ¹⁰³.

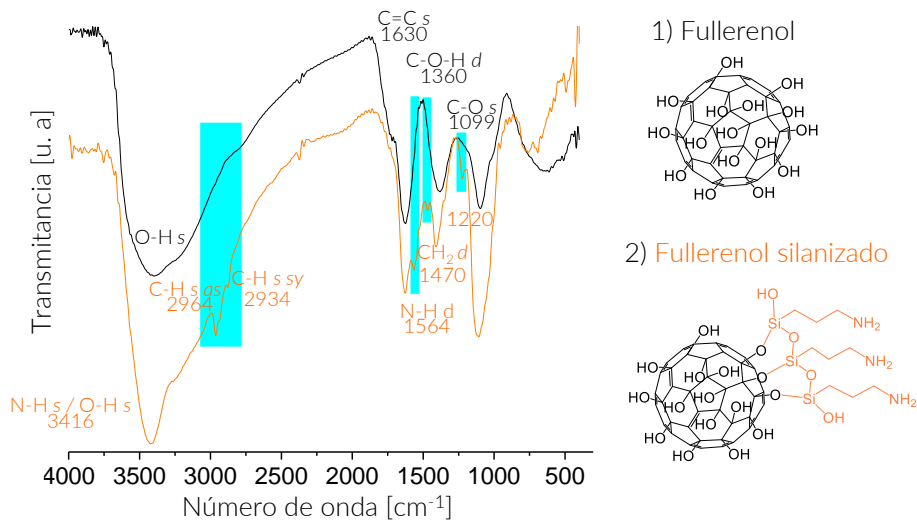


Figura 6-20. Espectros FTIR de (1) fullerenol, (2) fullerenol silanizado.

Los espectros FT-IR de los nanobioconjugados se componen de muchas bandas superpuestas de los modos vibracionales característicos del fullereno silanizado y las señales propias del péptido BUF-II y la proteína OmpA. En la OmpA libre y los nanobioconjugados OmpA-fullereno, se observan bandas centradas en 1654 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} y 1543 cm^{-1} que concuerdan con los modos vibracionales de amida I, II, y III (ver **Tabla 6.1**) superpuestas con las señales características del fullereno; así como señales propias de la proteína que no se observan en el fullereno silanizado (**Figura 6-21**)^{30,103,107}.

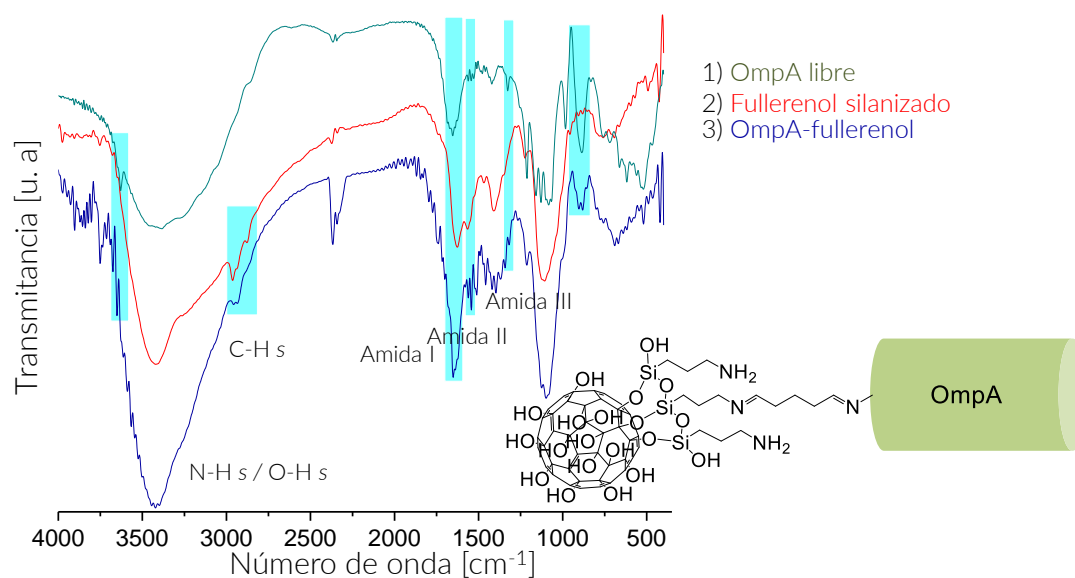


Figura 6-21. Espectros FTIR de (1) OmpA libre, (2) fullereno silanizado, (3) OmpA-fullereno.

En BUF-II libre y los nanobioconjugados BUF-II-PEG12-F, se observan bandas alrededor de 1662 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , y 1460 cm^{-1} que concuerdan con los modos vibracionales de amida I, II, y III (ver **Tabla 6.1**) superpuestas con las señales características del fullereno; así como señales propias del péptido que no se observan en el fullereno silanizado^{28,29,103}.

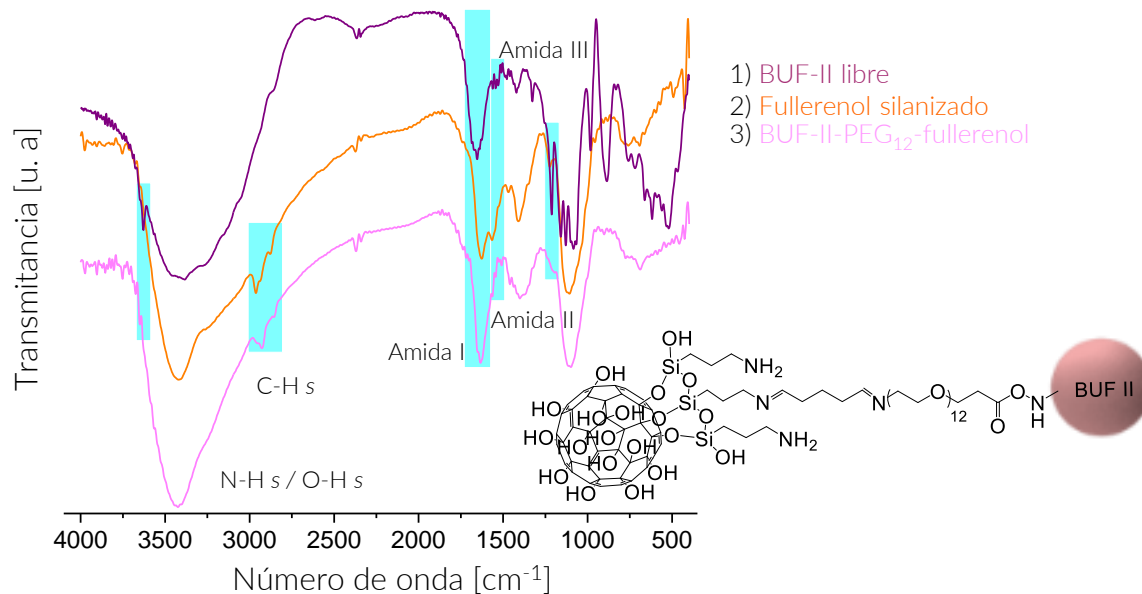


Figura 6-22. Espectros FTIR de (1) BUF-II libre, (2) fullerenol silanizado, (3) BUFII-PEG₁₂-fullerenol.

La **Figura 6-23** muestra la distribución de tamaño por intensidad. Los fullerenoles tienen un diámetro entre 1-2 nm⁶⁴, pero tienden a agregarse fácilmente^{65,72,126}. El fullerenol sintetizado, presentó dos poblaciones de agregados con diámetros hidrodinámicos alrededor de 2 y 14 nm (diámetro hidrodinámico promedio: 8 nm, índice de polidispersidad: 0,2).

El diámetro hidrodinámico promedio de los nanobioconjugados aumentó después de la conjugación del péptido y la proteína, a 12 nm para BUF-II-PEG₁₂-F y 18 nm para OmpA-fullerenol (**Nota:** el informe de calidad de medición del tamaño de estos nanobioconjugados, generado por el *software* del equipo (*Zeta-Sizer Nano-ZS; Malvern Instruments, Malvern, UK*), indicó que DLS podría no ser apropiado para esta medición ya que la muestra contenía también agregados y alta polidispersidad).

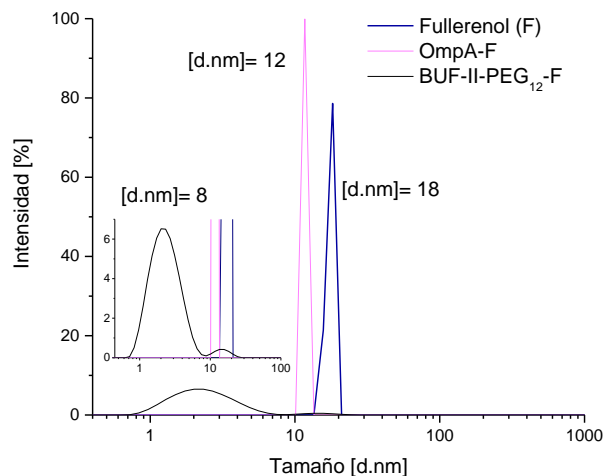


Figura 6-23. Distribución de tamaño por intensidad del fullerol y los nanobioconjugados basados en fullerol, determinados por DLS.

Las mediciones de Potencial ζ del fullerol sintetizado indican que en medio acuoso adquiere una carga superficial negativa de -20.4 ± 7.47 mV. Los valores de potencial ζ para los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OMPA-fullerol fueron $-12,9 \pm 0,40$ mV y $-19,9 \pm 0,65$ mV, respectivamente; estos nanobioconjugados a pH biológico tienden a precipitar.

Los resultados de TGA del fullerol purificado muestran una disminución en el peso de la muestra de $\sim 8,1\%$ después de calentarla desde temperatura ambiente hasta 100 °C, una segunda pérdida de $\sim 54,0\%$ en el rango de 100 - 570 °C y un $\sim 39,5\%$ de peso residual al calentar la muestra a temperaturas >570 °C (**Figura 6-24**). La pérdida de peso por debajo de 120 °C corresponde a la deshidratación de agua físicamente absorbida⁶⁴. De acuerdo con la literatura, la segunda pérdida peso corresponde a la deshidratación de los grupos hidroxilo del fullerol, antes de la degradación estructural del núcleo de fullereno que ocurre a temperaturas >570 °C^{64,92,127}.

A partir del análisis termogravimétrico se puede estimar el número de sustituyentes en las moléculas derivadas del fullereno¹²⁷. En este caso el número de grupos -OH unidos por molécula de fullereno se puede calcular de acuerdo la **Ecuación 5**:

$$\frac{720}{y} * \frac{x}{m} \quad (5)$$

Donde 720 es el peso molecular del fullereno C_{60} , se asume que x corresponde al porcentaje de peso perdido en el rango de temperatura de 120-570 °C, y el peso perdido y residual al calentar la muestra a temperaturas >570 °C, y m el peso de cada grupo unido (17 para cada grupo -OH) ¹²⁷. Entonces:

$$\frac{720}{54} * \frac{39}{17} = 31$$

Este valor estimado de 31 grupos -OH es cercano al reportado por Kokubo *et al.*, ^{64,65}. Sin embargo, se requieren técnicas más especializadas como RMN, espectrometría de masas, Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), análisis elemental, entre otras, para elucidar completamente la estructura del fullerenol sintetizado.

En el análisis por TGA el fullerenol silanizado y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, y OmpA-fullerenol pierden peso en cuatro rangos de temperatura: temperatura ambiente a 120°C, 120°C-340°C, 340°C-570°C y >570°C (**Figura 6-24**).

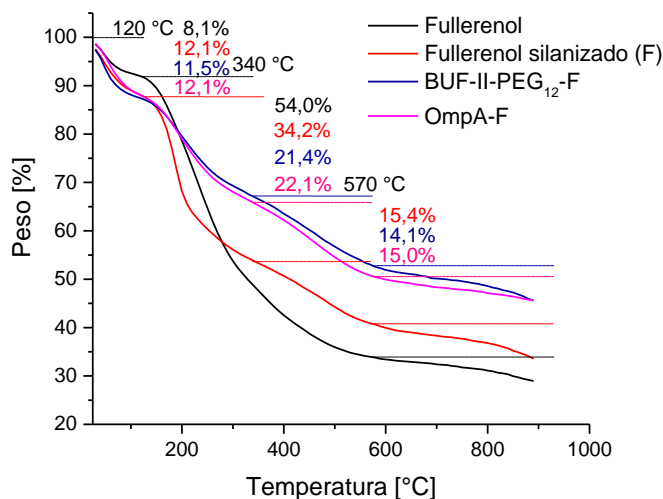


Figura 6-24. Termogramas del fullerenol purificado, fullerenol silanizado, y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, y OmpA-fullerenol.

El fullerenol silanizado, BUF-II-PEG₁₂-F, y OmpA-fullerenol presentaron una primera pérdida de peso de 12,1%, 11,5% y 12,1% debida principalmente a la pérdida de agua superficial. Goswami *et. al.*, reportaron que en el rango de temperatura de 150°C-570°C se remueven todos los sustituyentes unidos al fullereno ¹²⁷. Se observa una segunda pérdida

de peso de 34,2% para el fullerol silanizado, 21,4% y 22,1% en los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-fullerenol respectivamente. Entre 340-570°C se observó una tercera pérdida de peso de 15,4% para el fullerol silanizado, 14,1% y 15,0% en BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-fullerenol respectivamente. Estas pérdidas pueden atribuirse a la descomposición de grupos aminopropil para el fullerol silanizado y al desprendimiento de los agentes de conjugación y la BUF-II y OmpA en los nanobioconjugados.

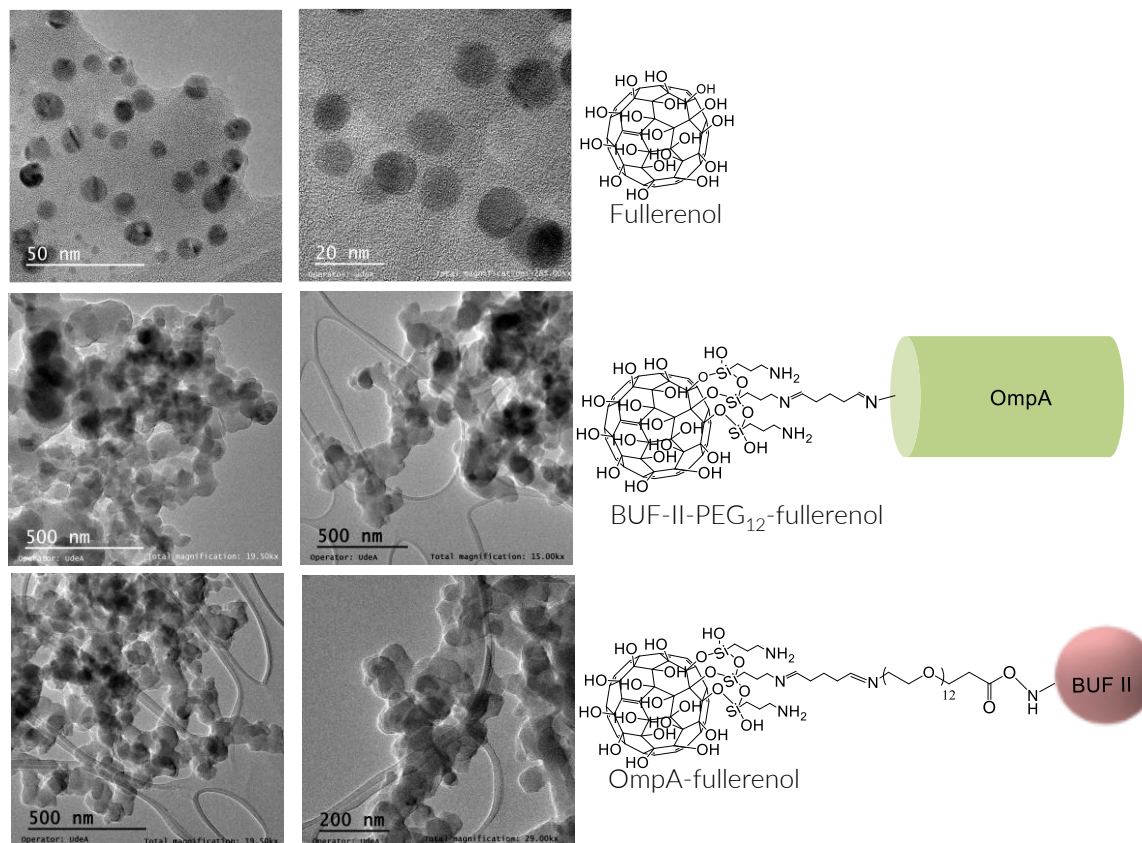


Figura 6-25. Micrografías electrónicas de transmisión de: a) fullerol b) Nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F c) Nanobioconjugados OMPA-fullerenol.

Las micrografías electrónicas de transmisión (**Figura 6-25**) del fullerol evidencian la formación de las dos poblaciones de agregados, corroborando los datos obtenidos mediante DLS. Se evidencia un cambio dramático en la morfología los nanobioconjugados posterior a la inmovilización del péptido y la proteína, así como formación de agregados. La agregación puede estar relacionada con el uso de glutaraldehído, reactivo de naturaleza bifuncional, con tendencia a la polimerización incontrolada durante el proceso de

conjugación ¹²⁸. Adicionalmente, la agregación observada en las imágenes TEM de los nanobioconjugados podría estar inducida por preparación de la muestra para la adquisición de las imágenes, en la cual se requiere la eliminación completa del líquido en el cual están dispersos estos nanomateriales.

6.5 Ensayos biológicos de los nanobioconjugados basados en fullereno

6.5.1 Detección de contaminación bacteriana en los nanobioconjugados basados en fullereno mediante placas de agar

Se realizó un ensayo de detección de contaminación microbiana de los nanobioconjugados basados en fullereno, sobre placas de medio de cultivo LB-agar (**Figura 6-26**).

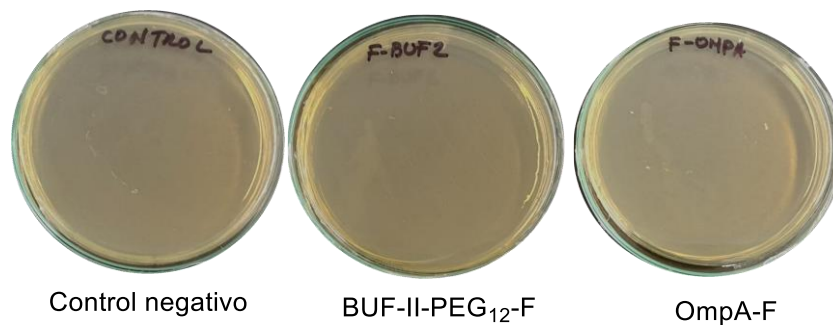


Figura 6-26. Detección de contaminación bacteriana mediante placas de agar.

Ni en el control negativo, ni en los nanobioconjugados basados en fullereno se observaron unidades formadoras de colonias. Los resultados evidencian la efectividad de las condiciones de esterilidad mantenidas durante el proceso de síntesis y funcionalización del fullereno, evitando así, eventos de contaminación cruzada en los ensayos biológicos posteriores ¹¹⁸.

6.5.2 Biocompatibilidad de los nanobioconjugados basados en fullereno

La **Figura 6-27a** muestra la viabilidad celular en las células THP-1 (ATCC® TIB-202) y Vero (ATCC® CCL-81) tras 24 y 48 horas de exposición a los nanobioconjugados basados en fullereno, respectivamente. Los resultados mostraron un perfil de viabilidad dependiente de la concentración en ambas líneas celulares y en todos los tratamientos probados. A dosis bajas (18 y 37 $\mu\text{g/mL}$) de los tratamientos, la viabilidad celular no se redujo significativamente en ninguna de las dos líneas celulares.

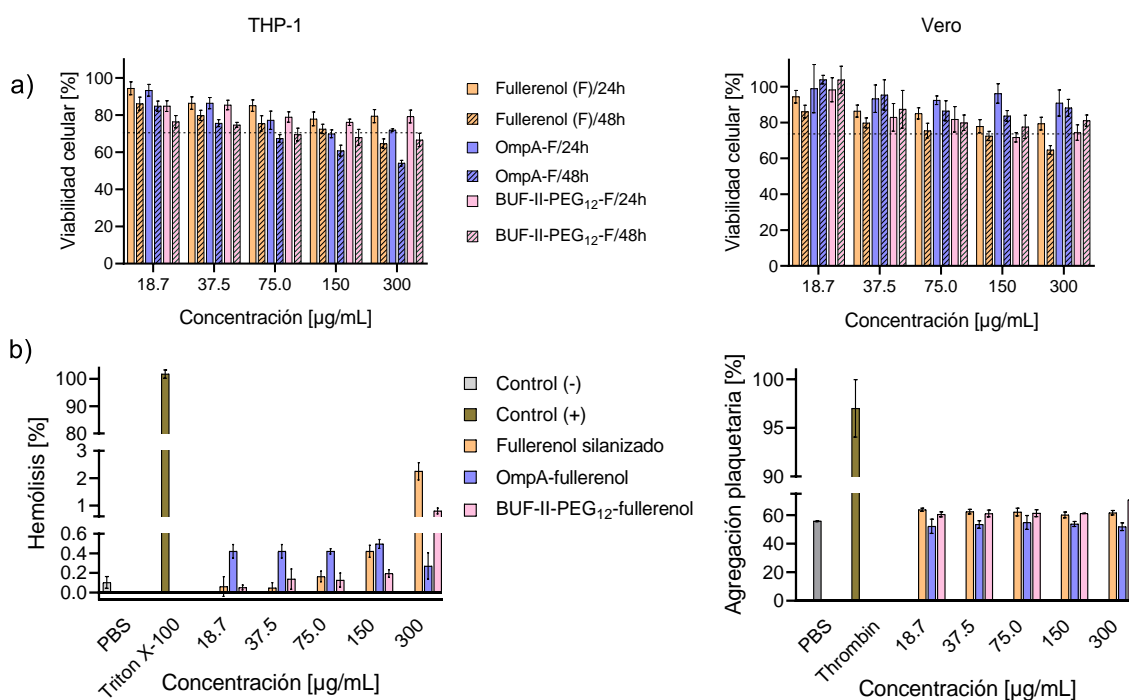


Figura 6-27. a) Evaluación de la citotoxicidad de los nanobioconjugados basados en fullereno mediante ensayos de MTT después de 24 y 48 horas. b) Evaluación *in vitro* de la hemocompatibilidad. Evaluación del efecto hemolítico de los nanobioconjugados basados en fullereno (Control positivo: Tritón X-100, control negativo: PBS; y evaluación de la agregación plaquetaria *in vitro* (Control positivo: Trombina, control negativo: PBS).

La **Figura 6-27b** muestra la evaluación *in vitro* de la hemocompatibilidad. No hubo ningún efecto hemolítico significativo inducido por el fullereno o los nanobioconjugados basados en fullereno, los valores de hemólisis se mantuvieron por debajo del 3% ¹²¹. Los tratamientos revelaron valores de agregación plaquetaria entre el 2-15% por encima de la referencia negativa en el fullereno y los conjugados BUF-II-PEG₁₂-F, y ninguna diferencia

significativa con la referencia negativa en los nanobioconjugados OmpA-fullerenol. Valores superiores al 20% se consideran que inducen agregación plaquetaria ⁹⁵.

6.5.3 Translocación y escape endosomal de los nanobioconjugados basados en fullerenol

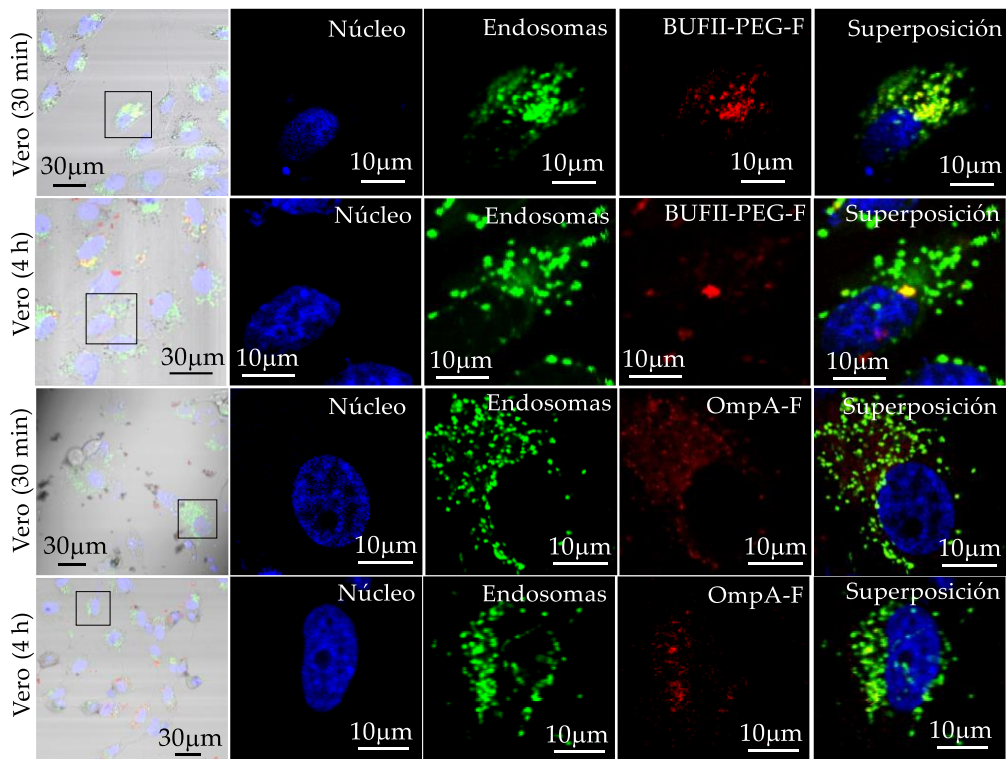


Figura 6-28. Imágenes de microscopía confocal de células Vero (ATCC® CCL-81), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F durante 30 minutos y 4 horas.

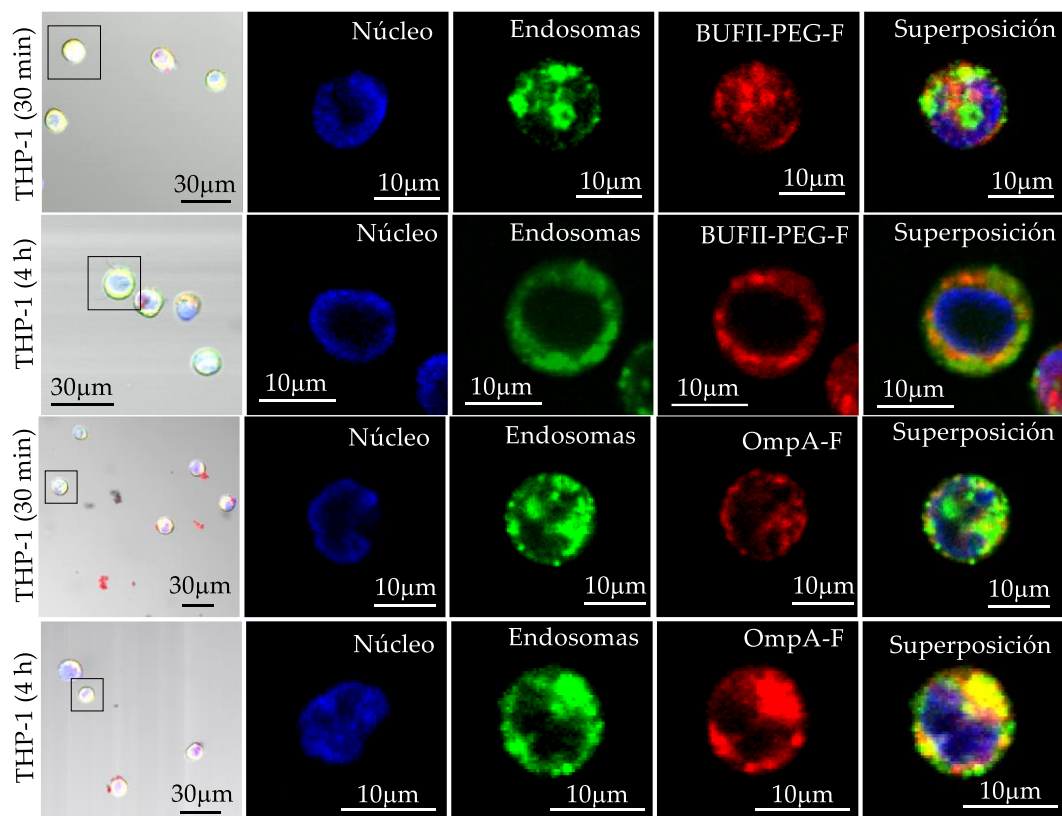


Figura 6-29. Imágenes de microscopía confocal de células THP-1 (ATCC® TIB-202), expuestas a los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F durante 30 minutos y 4 horas.

Las **Figuras 6-28** y **6-29** evidencian la internalización de los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-fullerenol por las células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202) después de 30 minutos y 4 horas; corresponden a una muestra de las diferentes imágenes analizadas (**ver sección 5.2**). Primero se muestra la superposición de todos los canales, evidenciando la morfología e integridad celular. A diferencia de los nanobioconjugados basados en SNPs, en las imágenes obtenidas por microscopía confocal de los nanobioconjugados basados en fullerenol, se observó una mayor tendencia a la formación de agregados de partículas, lo cual puede tener importantes consecuencias en su comportamiento en aplicaciones biológicas. En las siguientes imágenes, en vistas ampliadas de los recuadros, se muestran los núcleos marcados con DAPI (azul), los endosomas marcados con *Lysotracker green* (verde), y los nanobioconjugados marcados con rodamina B (rojo). Los nanobioconjugados (rojo) se visualizaron distribuidos de forma homogénea en el interior de las células sin alcanzar significativamente el núcleo (azul). En

la superposición de los tres canales, las áreas de color “amarillo” evidencian de forma visual y cualitativa la colocación de los endosomas y los nanobioconjugados.

Los valores de CCP fueron de $0,23\pm 0,11$ y $0,28\pm 0,11$ para los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F, respectivamente, después de 30 minutos en las células Vero (ATCC® CCL-81). Estos valores de CCP aumentaron a $0,37\pm 0,17$ y $0,29\pm 0,08$; para BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F, respectivamente, después de 4 horas (**Figura 6-30a**). Estos valores de CCP menores a 0,5 indican una baja colocación entre los nanobioconjugados y los endosomas. La alta cobertura del área citoplasmática por las partículas confirma la internalización de los nanobioconjugados, los cuales probablemente ingresen a las células Vero (ATCC® CCL-81) a través de mecanismos diferentes a la endocitosis (**Figura 6-30b**).

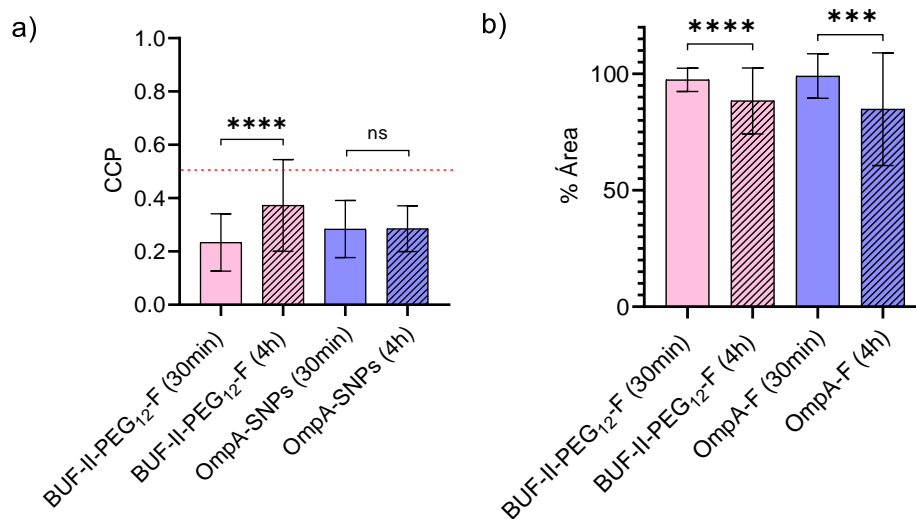


Figura 6-30. a) CCP para la colocación de los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, OmpA-F y compartimentos intracelulares con valores de pH ácidos (lisosomas/endosomas) tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas.⁷ b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, OmpA-F distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células Vero (ATCC® CCL-81) durante 30 minutos y 4 horas.⁸

⁷ Los valores de CCP <0,5 (línea punteada) indican una baja probabilidad de que los pixeles de ambos canales estén colocados.

⁸ En las gráficas, el término "ns" significa diferencia no significativa, y el número de asteriscos indica el grado de diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos (Ver sección 5.7.5).

Para las células THP-1 (ATCC® TIB-202), los valores de CCP fueron de $0,83\pm 0,07$ y $0,77\pm 0,11$ para BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F, respectivamente, después de 30 minutos. Estos valores de CCP decrecieron a $0,74\pm 0,16$ y $0,74\pm 0,12$ para BUF-II-PEG₁₂-F y OmpA-F, respectivamente, después de 4 horas; indicando una tendencia de los nanobioconjugados a escapar de los endosomas (**Figura 6-31a**). La alta cobertura del área citoplasmática por los nanobioconjugados confirma su internalización efectiva (**Figura 6-31b**).

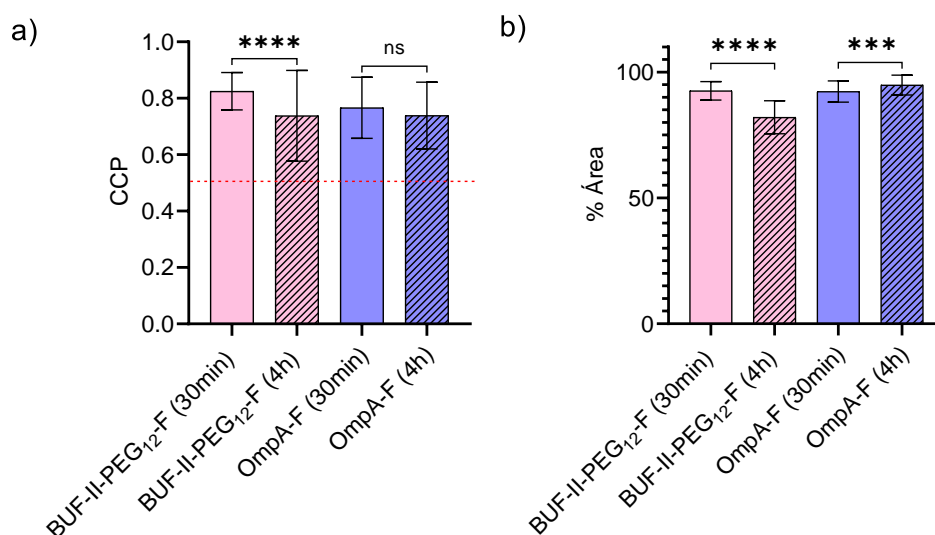


Figura 6-31. a) CCP para la colocalización de los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, OmpA-F y compartimientos intracelulares de pH ácidos (lisosomas/endosomas).⁹ b) Porcentaje de área cubierta por las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-F, OmpA-F distribuidos en el espacio intracelular, tras exposición a células THP-1 (ATCC® TIB-202) durante 30 minutos y 4 horas.¹⁰

⁹ Los valores de CCP >0.5 (línea punteada) indican una alta probabilidad de que los pixeles de ambos canales estén colocalizados.

¹⁰ En las gráficas, el término "ns" significa diferencia no significativa, y el número de asteriscos indica el grado de diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos (Ver sección 5.7.5).

7. Conclusiones y Recomendaciones

Presentamos una metodología factible para la inmovilización del péptido BUF-II y la proteína OmpA en SNPs y fullerenol. Diferentes técnicas analíticas permitieron la caracterización de los nanobioconjugados obtenidos (OmpA-SNPs, BUF-II-PEG₁₂-SNPs, OmpA-F y BUF-II-PEG₁₂-F), en términos de tamaño, carga, morfología y funcionalización de la superficie, confirmando la conjugación de dichos agentes translocantes en las SNPs y fullerenol. Los nanobioconjugados sintetizados mostraron alta biocompatibilidad en las líneas celulares Vero y THP-1. En las concentraciones evaluadas no mostraron efecto hemolítico significativo, así como baja tendencia a inducir agregación plaquetaria. Mediante microscopía confocal se evidenció la efectiva internalización de los diferentes nanobioconjugados en células Vero (ATCC® CCL-81) y THP-1 (ATCC® TIB-202) sin alcanzar significativamente la región nuclear.

Los nanobioconjugados OmpA-SNPs y BUF-II-PEG₁₂-SNPs mostraron tendencia a escapar de los endosomas en las células Vero y a permanecer atrapados en los endosomas en las células THP-1. Por otra parte, los nanobioconjugados OmpA-F y BUF-II-PEG₁₂-F fueron internalizados efectivamente por estas dos líneas celulares con una tendencia superior a escapar de los endosomas en células Vero. Este comportamiento es interesante, ya que se hace necesario el desarrollo de sistemas de entrega de cargos suficientemente ajustables de acuerdo con las necesidades del tratamiento y el tipo de células u organelos blanco.

Los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs mostraron una actividad antimicrobiana contra *S. aureus* superior en comparación con las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados OmpA-SNPs, probablemente debido a la actividad del péptido antimicrobiano. No se observó actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

Los resultados obtenidos aquí confirman el potencial de estos nanobioconjugados de trabajar de manera sinérgica para mejorar la estabilidad y la vida media de las biomoléculas translocantes (BUF-II y OmpA) y atravesar membranas biológicas sin afectar la viabilidad celular. También, su capacidad en algunos casos de escapar de endosomas y en otros casos de permanecer al interior de estos, lo cual abre oportunidades para

abordar los desafíos de liberación citoplasmática de fármacos o el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Se recomienda continuar la investigación de estos materiales con el objetivo, por ejemplo, de elucidar las vías de internalización, tráfico en las células, y los mecanismos de escape endosomal. Además, se recomienda investigar una aplicación específica para el transporte de un cargo y su eficacia *in vivo*, ya que no siempre corresponden con los resultados obtenidos *in vitro*.

A. Anexo: Cálculo de NH₂ disponibles para la conjugación según el tamaño de partícula

Tabla A1. Datos generales

	SNPs	Fullerenol
Diámetro [mm]	1,76x10 ⁻⁴	8,0x10 ⁻⁶
Densidad [g/cm³]	2,2	1,3 ¹²⁹
W [gramos]	0,1	0,1

	APTES 107	Glutaraldehído 107	NH ₂ -PEG ₁₂ -ac. propiónico	OmpA	BUF- II
Área superficial (as) [mm²]	5,37 x10 ⁻¹³	3,41 x10 ⁻¹³			
Densidad [g/cm³]	0,946				
MW [g/mol]	221,37	100,12	617,72	35000	2434,8
Pureza [%]	99	25	97	94	99

1. Para los ensayos de conjugación se emplearon 100 mg de nanopartículas de sílice (SNPs):

Asumiendo una morfología esférica (basados en las imágenes de microscopía electrónica)

$$\text{Área SNPs } (A_{SNPs}) = 4\pi r^2$$

$$(A_{SNPs}) = 4\pi \left(\frac{1,76 \times 10^{-4} \text{ mm}}{2} \right)^2 = 9,73 \times 10^{-8} \text{ mm}^2 = 9,73 \times 10^{13} \text{ nm}^2$$

$$\text{Volumen SNPs } (V_{SNPs}) = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$(V_{SNPs}) = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{1,76 \times 10^{-4} \text{ mm}}{2} \right)^3 = 2,85 \times 10^{-12} \text{ mm}^3$$

$$(W_{SNPs}) = 2,2 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} * \frac{1 \text{ cm}^3}{(10 \text{ mm})^3} * 2,85 \times 10^{-12} \text{ mm}^3 = 6,85 \times 10^{-15} \text{ g}$$

Cálculos de la cantidad de APTES (se supone una molécula esférica):

Número de moléculas ($N_{moléculas}$) de APTES en una partícula:

Para las nanopartículas de sílice (SNPs):

$$N_{moléculas} = \frac{A_{SNPs}}{as\ APTES}$$

$$N_{moléculas} = \frac{9,73 \times 10^{-8} mm^2}{5,37 \times 10^{-13} mm^2} = 181210\ moléculas\ de\ APTES$$

Según los cálculos teóricos, habrá 181210 grupos NH_2 disponibles para la funcionalización.

Se estima una concentración superficial de grupos OH (número de silanoles) en las SNPs de 4.9 grupos OH/nm².¹³⁰ Esto equivaldría a 4.77×10^{14} grupos OH en la superficie de las SNPs de 176 nm (Área = $9,73 \times 10^{13} nm^2$).

Número de partículas en los 100 mg ($N_{partículas}$):

$$N_{SNPs} = \frac{0,100\ g}{W_{SNPs}} = \frac{0,100\ g}{6,85 \times 10^{-15} g} = 1,46 \times 10^{13} SNPs$$

Número de moles (N_{mol}) de APTES requeridos:

$$N_{mol} = \frac{N_{SNPs} * N_{moléculas\ APTES}}{6,02 \times 10^{23}\ moléculas/mol}$$

$$N_{mol} = \frac{1,46 \times 10^{13} SNPs * 181210\ moléculas\ de\ APTES}{6,02 \times 10^{23}\ moléculas/mol} = 4,39 \times 10^{-6}\ moles\ de\ APTES$$

Al usar un exceso de APTES, glutaraldehído y la misma cantidad de sitios COOH del extremo carboxilo del NH_2 -PEG₁₂-ácido propiónico, la cantidad de moléculas de péptido o proteína que se deben agregar para saturar los sitios activos de funcionalización serían:

$$W_{BUF-II} = 4,39 \times 10^{-6}\ moles\ de\ BUF - II * MW\ BUF - II$$

$$W_{BUF-II} = 4,39 \times 10^{-6}\ moles\ de\ BUF - II * 2434,8 \frac{g}{mol} = 0,0107\ g$$

$$W_{BUF-II} = 0,0107\ g * \frac{100\%}{99\%} = 0,0108\ g\ de\ BUF - II = 10,8\ mg\ de\ BUF - II$$

Por costoeficiencia y porque el objetivo no era saturar todos los sitios disponibles, en esta reacción de bioconjugación de la OmpA a las SNPs se usaron solo 1 mg de BUF-II por cada 100 mg de SNPs.

$$W_{OmpA} = 4,39 \times 10^{-6} \text{ moles de OmpA} * MW_{ompA}$$

$$W_{OmpA} = 4,39 \times 10^{-6} \text{ moles de OmpA} * 35000 \frac{g}{mol} = 0,1538 g$$

$$W_{OmpA} = 0,1538 g * \frac{100\%}{94\%} = 0,163 g \text{ de OmpA} = 163,6 mg \text{ de OmpA}$$

En esta reacción de bioconjugación de la OmpA a las SNPs se usaron solo 30 mg de OmpA por cada 100 mg de SNPs.

Diferentes técnicas se pueden emplear para determinar de forma cuantitativa estos grupos amino disponibles, por ejemplo, mediante análisis termogravimétrico, RMN cuantitativa, XPS, titulaciones conductimétricas, entre otros.¹¹⁴

B.Anexo: Variación del tamaño de partícula en función de la longitud de la cadena del alcohol empleado en la síntesis de SNPs

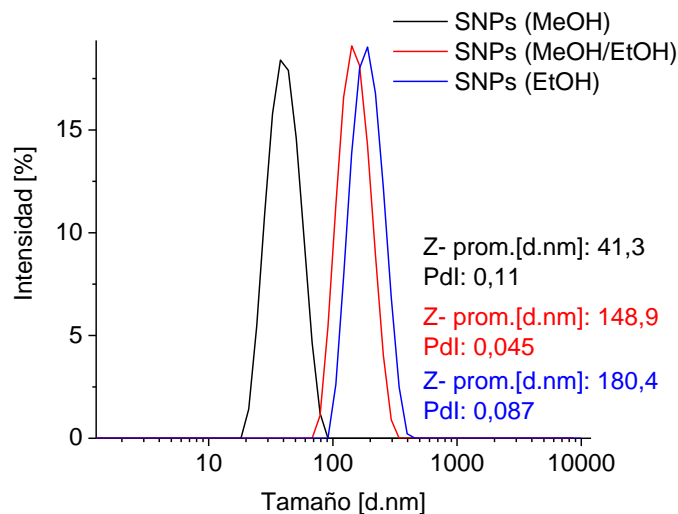


Figura B-1. Histograma para la distribución de tamaño por intensidad por DLS de las SNPs sintetizadas variando el tipo de alcohol empleado en la síntesis. Las SNPs se obtuvieron con un diámetro hidrodinámico promedio de 41,3 nm (Pdl: 0,11), 148,9 nm (Pdl: 0,045) y 180,4 nm (Pdl: 0,087), usando metanol, mezcla de metanol:etanol 1:1, y etanol, respectivamente.

C. Anexo: Aspecto de las suspensiones de los nanobioconjugados en solución acuosa

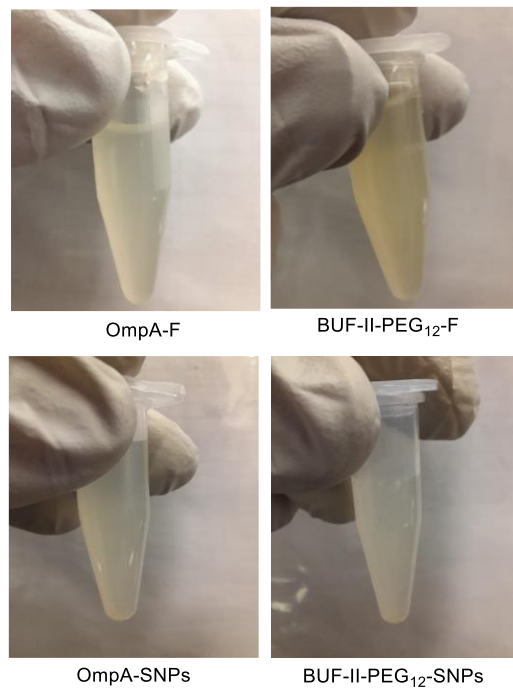


Figura C-1. Nanobioconjugados basados en SNPs y fullerenol en suspensión acuosa. En las concentraciones (18,7-300 $\mu\text{g/mL}$) evaluadas en los ensayos biológicos las suspensiones eran estables.

D. Anexo: Problemas de estabilidad de los nanobioconjugados basados en SNPs en los solventes deuterados

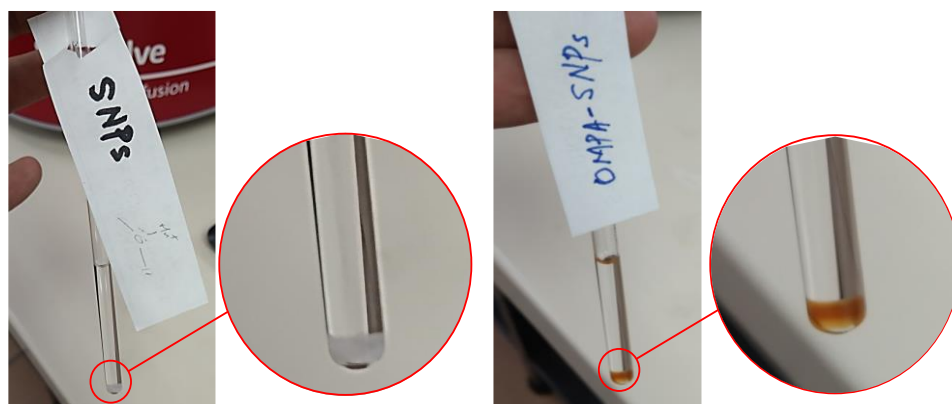


Figura D-1. Problemas de baja solubilidad y estabilidad los SNPs silanizadas y los nanobioconjugados en los solventes deuterados (D_2O , $DMSO-d$) para los análisis de RMN. Se suspendieron de 10-20 mg nanomateriales en 0,6-0,7 mL de solvente deuterado en tubos de RMN de 5 mm de diámetro; como se puede observar, la muestra precipita en el tiempo que tardan los diferentes análisis (2-40 minutos).

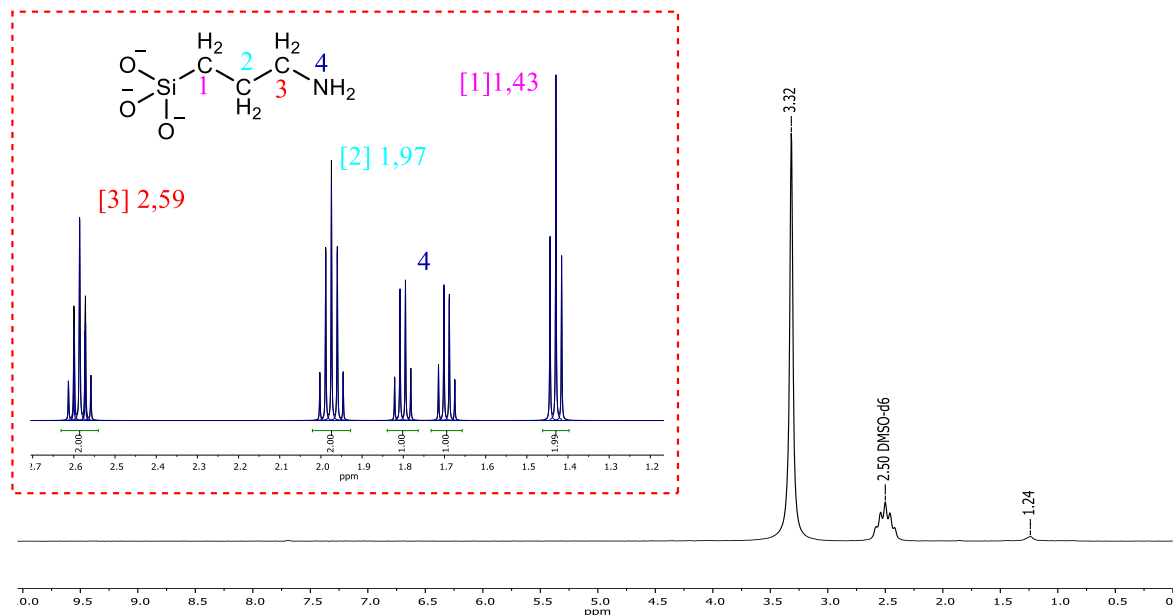


Figura D-2. Espectro ^1H -RMN de SNPs silanizadas dispersadas en DMSO-d_6 , tomado en un espectrómetro Magritek, Spinsolve de 43 MHz.

Probablemente, debido a la baja solubilidad y estabilidad que presentaron las SNPs silanizadas y los nanobioconjugados en los solventes deuterados (DMSO-d_6 y D_2O) no se observaron las señales correspondientes a los protones de los grupos propilamina. Las señales observadas corresponden a la señal del DMSO-d_6 (2,50 ppm) y a una señal en 3,32 ppm, posible impureza residual de agua del DMSO-d_6 ¹³¹. En el recuadro punteado se presenta una simulación de las señales esperadas la cual fue obtenida con el software MestReNova. Existen reportes donde se emplean ^1H -RMN y DOSY para la identificación de grupos aminopropil posterior a la hidrólisis de los mismos¹³².

Adicionalmente, limitaciones instrumentales también afectaron la obtención de buenos resultados (los análisis se realizaron en espectrómetro Spinsolve de 43 MHz; este equipo es considerado de baja sensibilidad en comparación con los sistemas empleados comúnmente de 400 MHz).

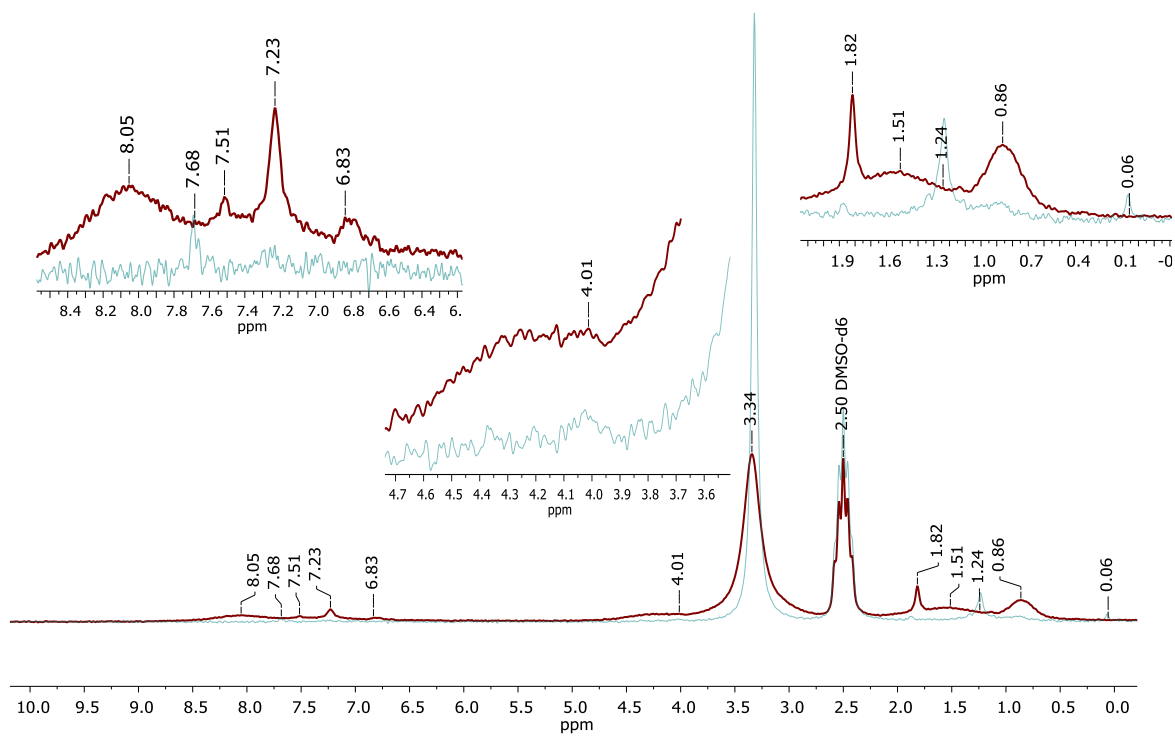


Figura D-3. Superposición de los espectros ^1H -RMN de BUF-II libre (rojo) y los nanobioconjugados BUF-II-PEG₁₂-SNPs (azul) dispersados en DMSO-d₆, tomado en un espectrómetro Magritek, Spinsolve de 43 MHz.

Bibliografía

1. Hossen, S., Hossain, K., Basher, M. K., Mia, M. N. H. & Rahman, M. T. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies : A review. *J. Adv. Res.* **1**, 1–74 (2018).
2. Gonçalves, M. C. Sol-gel Silica Nanoparticles in Medicine: A Natural Choice. Design, Synthesis and Products. *Molecules* **23**, 2021 (2018).
3. McNeil, S. E. Unique Benefits of Nanotechnology to Drug Delivery and Diagnostics. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 3–8 (2011). doi:10.1007/978-1-60327-198-1.
4. Yokoyama, T. Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. in *Nanoparticle Technology Handbook* (eds. Naito, M., Yokoyama, T., Hosokawa, K. & Nogi, K.) 3–48 (2018).
5. McNeil, S. E. Evaluating Nanomedicines: Obstacles and Advancements. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 3–16 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7352-1.
6. Barua, S. & Mitragotri, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nanotoday* **9**, 223–243 (2014).
7. Degors, I. M. S., Wang, C., Rehman, Z. U. & Zuhorn, I. S. Carriers Break Barriers in Drug Delivery : Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors Published as part of the Accounts of Chemical Research special issue “ Nanomedicine and Beyond ” . *Acc. Chem. Res.* **52**, 1750–1760 (2019).
8. Ke, P. C., Lin, S., Parak, W. J., Davis, T. P. & Caruso, F. A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano* **11**, 11773–11776 (2017).
9. Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779–786 (2012).
10. Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P. & Pan, G. Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. *Drug Deliv.* **26**, 328–342 (2019).
11. Mosquera, J., García, I. & Liz-Marzán, L. M. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc. Chem. Res.* **51**, 2305–2313 (2018).
12. Selby, L. I., Cortez-Jugo, C. M., Such, G. K. & Johnston, A. P. R. Nanoescapology:

- progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **9**, (2017).
13. Parenti, G., Pignata, C., Vajro, P. & Salerno, M. New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 11–20 (2013).
 14. Sun, A. Lysosomal storage disease overview. *Ann. Transl. Med.* **6**, 476–476. (2018).
 15. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
 16. Behzadi, S. *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4218–4244 (2017).
 17. Stober, W. & Fink, A. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. colloid interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
 18. Shi, S., Chen, F. & Cai, W. Biomedical applications of functionalized hollow mesoporous silica nanoparticles: Focusing on molecular imaging. *Nanomedicine* **8**, 2027–2039 (2013).
 19. Singh, P., Srivastava, S. & Singh, S. K. Nanosilica: Recent Progress in Synthesis, Functionalization, Biocompatibility, and Biomedical Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 4882–4898 (2019).
 20. Hermanson, G. T. Microparticles and Nanoparticles. in *Bioconjugate Techniques* 549–587 (2013).
 21. Kazemzadeh, H. & Mozafari, M. Fullerene-based delivery systems. *Drug Discov. Today* **24**, 898–905 (2019).
 22. Mi, P., Cabral, H. & Kataoka, K. Ligand-Installed Nanocarriers toward Precision Therapy. *Adv. Mater.* **32**, 1–29 (2020).
 23. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry* vol. 30 263–272 (2019).
 24. Ahmad, A., Khan, J. M. & Haque, S. Strategies in the design of endosomolytic agents for facilitating endosomal escape in nanoparticles. *Biochimie* **160**, 61–75 (2019).
 25. Chakraborty, S., Dhakshinamurthy, G. S. & Misra, S. K. Tailoring of physicochemical properties of nanocarriers for effective anti-cancer applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **105**, 2906–2928 (2017).
 26. Biffi, S., Voltan, R., Bortot, B., Zauli, G. & Secchiero, P. Actively targeted nanocarriers for drug delivery to cancer cells. *Expert Opin. Drug Deliv.* **16**, 481–496 (2019).
 27. Kanwal, U. *et al.* Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated

- insight. *J. Drug Target.* **26**, 296–310 (2018).
28. Cuellar, M. *et al.* Novel BUF2-magnetite nanobioconjugates with cell-penetrating abilities. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 8087–8094 (2018).
 29. Perez, J. *et al.* Cell-Penetrating And Antibacterial BUF-II Nanobioconjugates: Enhanced Potency Via Immobilization On Polyetheramine-Modified Magnetite Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 8483–8497 (2019).
 30. López-Barbosa, N. *et al.* Magnetite-OmpA nanobioconjugates as cell- penetrating vehicles with endosomal escape abilities. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **6**, 415–424 (2019).
 31. Duarte-Ruiz, Á., Echegoyen, L., Aya, A. & Gómez-Baquero, F. A new method to prepare an e,e,e trisadduct of C60 using a protection-deprotection sequence. *J. Mex. Chem. Soc.* **53**, 169–173 (2009).
 32. Duarte-Ruiz, A., Wurst, K. & Kräutler, B. The orthogonal (e,e,e)-tris-adduct of 9,10-dimethylantracene with C 60-fullerene: A hidden cornerstone of fullerene chemistry. Preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* **91**, 1401–1408 (2008).
 33. Torres Palacio, P., Cano Beníte, C. A. & Duarte Ruiz, Á. Self-assembly of a supramolecular square between [ni(Dppe)(tof)2] and 4,4'-bipyridine. *Rev. Colomb. Quim.* **42**, 48–55 (2013).
 34. Cano-Benítez, C. A., Metta-Magaña, A. J. & Duarte-Ruiz, Á. Crystal structure at 100 K of bis[1,2-bis(diphenylphosphanyl)ethane]nickel(II) bis(trifluoromethanesulfonate): A possible negative thermal expansion molecular material. *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* **74**, 1678–1681 (2018).
 35. Duarte-Ruiz, A., Iuele, H., Torres-Cortés, S., Meléndez, A. & Chaur, M. N. Physical and Inorganic Chemistry Synthesis and characterization of C60 and C70 acetylacetone monoadducts and study of their photochemical properties for potential application in solar cells Síntesis y caracterización de monoadductos de C60 y C70. *Revista* **50**, 86–97 (2021).
 36. Neti, V. S. P. K. *et al.* High-yield, regiospecific bis-functionalization of C70 using a diels–alder reaction in molten anthracene. *Chem. Commun.* **50**, 10584–10587 (2014).
 37. Duarte-Ruiz, Á. *et al.* Synthesis and structure of [Na4(DMSO)15][(I 3)3(I)]. Self-assembly of hexacoordinated sodium. *Chem. Commun.* **47**, 7110–7112 (2011).
 38. Yokoyama, T. Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. in *Nanoparticle Technology Handbook* 3–8 (2018).
 39. Kamyshny, A. & Magdassi, S. Aqueous Dispersions of Metallic Nanoparticles. in *Nanoscience* 747–778 (2010).
 40. Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M. & Yokoyama, T. Basic Properties And Measuring Methods Of Nanoparticles. in *Nanoparticle Technology Handbook* 5–9

- (2007).
41. Hermanson, G. T. Silane Coupling Agents. in *Bioconjugate Techniques* 535–548 (2013).
 42. Deetz, J. D. *et al.* Reactive Molecular Dynamics Simulations of the Silanization of Silica Substrates by Methoxy- and Hydroxysilanes. *Langmuir* **1**, 1–24 (2016).
 43. Hermanson, G. T. Homobifunctional Crosslinkers. in *Bioconjugate Techniques* 275–298 (2013).
 44. Hermanson, G. T. Zero-Length Crosslinkers. in *Bioconjugate Techniques* 259–274 (2013).
 45. Voet, D. & Voet, I. Lipids and Membranes. in *Biochemistry* 386–466 (2011).
 46. Mayor, S., Parton, R. G. & Donaldson, J. G. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
 47. Podinovskaia, M. & Spang, A. The Endosomal Network: Mediators and Regulators of Endosome Maturation. in *Endocytosis and Signaling* 1–38 (2018). doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-319-96704-2>.
 48. Cupic, K. I., Rennick, J. J., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. Controlling endosomal escape using nanoparticle composition : current progress and future perspectives. *Nanomedicine* **14**, 215–223 (2019).
 49. Hermanson, G. T. Introduction to Bioconjugation. in *Bioconjugate Techniques* 1–125 (2013).
 50. Camargo, M. & Groot, H. El secreto antimicrobiano de las histonas. *Hipótesis, Apunt. científicos uniandinos* **16**, 14–16 (2014).
 51. Park, C. B., Kim, M. S. & Kim, S. C. A Novel Antimicrobial Peptide from Bufo bufo gargarizans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 408–413 (1996).
 52. Park, C. B., Yi, K., Matsuzaki, K., Kim, M. S. & Kim, S. C. Structure – activity analysis of buforin II , a histone H2A-derived antimicrobial peptide : The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *PNAS* **97**, 8245–8250 (2000).
 53. Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. A. & Fagan, R. P. A molecular Swiss army knife : OmpA structure , function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 1–11 (2007).
 54. Pautsch, A. & Schulz, G. E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1013–1017 (1998).
 55. Shukla, T., Upmanyu, N., Pandey, S. P. & Sudheesh, M. S. Site-specific drug delivery, targeting, and gene therapy. in *Nanoarchitectonics in Biomedicine* 473–505 (2019).

56. Kim, W. *et al.* A reliable approach for assessing size-dependent effects of silica nanoparticles on cellular internalization behavior and cytotoxic mechanisms. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 7375–7387 (2019).
57. Goodarzi, S., Da Ros, T., Conde, J., Sefat, F. & Mozafari, M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Mater. Today* **20**, 460–480 (2017).
58. Semenov, K. N. *et al.* Fullerenols: Physicochemical properties and applications. *Prog. Solid State Chem.* **44**, 59–74 (2016).
59. Chiang, L. Y., Wang, L. Y., Swirczewski, J. W., Soled, S. & Cameron, S. Efficient Synthesis of Polyhydroxylated Fullerene Derivatives via Hydrolysis of Polycyclosulfated Precursors. *J. Org. Chem.* **59**, 3960–3968 (1994).
60. Li, J. *et al.* C60 fullerol formation catalysed by quaternary ammonium hydroxides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1784–1785 (1993) doi:10.1039/C39930001784.
61. Wang, S., He, P., Zhang, J. M., Jiang, H. & Zhu, S. Z. Novel and efficient synthesis of water-soluble [60]fullerenol by solvent-free reaction. *Synth. Commun.* **35**, 1803–1808 (2005).
62. Gomez, S. & Duarte, A. Síntesis de fulleroles a partir de un derivado bromado de C60. *Revista Colombiana de Química* vol. 38 83–95 (2009).
63. Afreen, S., Kokubo, K., Muthoosamy, K. & Manickam, S. Hydration or hydroxylation: Direct synthesis of fullereneol from pristine fullerene [C60] via acoustic cavitation in the presence of hydrogen peroxide. *RSC Adv.* **7**, 31930–31939 (2017).
64. Kokubo, K., Shirakawa, S., Kobayashi, N., Aoshima, H. & Oshima, T. Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fullereneol as a single nanoparticle. *Nano Res.* **4**, 204–215 (2011).
65. Kokubo, K., Matsubayashi, K., Tategaki, H., Takada, H. & Oshima, T. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups. *ACS Nano* **2**, 327–333 (2008).
66. Planque, M. R. R. De, Aghdaei, S., Roose, T. & Morgan, H. Electrophysiological Characterization of Membrane Disruption by Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 3599–3606 (2011).
67. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
68. Jiang, W. E. N., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 145–150 (2008).
69. Chaudhuri, A., Battaglia, G. & Golestanian, R. The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles. *Phys. Biol.* **8**, 1–9 (2011).

70. Soenen, S. *et al.* Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles: A Multiparametric Study. *ACS Nano* **6**, 5767–5783 (2012).
71. Edrissi, M., Soleymani, M. & Adinehnia, M. Synthesis of Silica Nanoparticles by Ultrasound-Assisted Sol-Gel Method : Optimized by Taguchi Robust Design. *Chem. Eng. Technol.* **34**, 1813–1819 (2011).
72. Kovač, T., Borišev, I., Crevar, B., Kenjeric, F. Č. & Ko, M. Fullerol C60(OH)24 nanoparticles modulate aflatoxin B 1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Sci. Rep.* **60**, 1–8 (2018).
73. Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-lorenzo, L., Rothen-rutishauser, B. & Petrifink, A. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chem. Rev.* **117**, 11476–11521 (2017).
74. Li, Y. & Gu, N. Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes : A Simulation Study. *J. Phys. Chem.* **114**, 2749–2754 (2010).
75. Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A. & Xia, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I 2 / KI Etchant 2009. *Nano Lett.* **9**, 1080–1084 (2009).
76. Mahmoudi, M. *et al.* Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnol. Adv.* **1**, 1–14 (2014).
77. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–51 (2015).
78. Adijanto, J. & Naash, M. I. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1**, 1–15 (2015).
79. Rüter, C., Buss, C., Scharnert, J., Heusipp, G. & Schmidt, M. A. A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *J. Cell Sci.* **123**, 2190–2198 (2010).
80. Akishiba, M. *et al.* Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.* **9**, 751–761 (2017).
81. Sun, T. *et al.* Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Rev.* **53**, 2–47 (2014).
82. Lin, G. *et al.* Non-viral gene therapy using multifunctional nanoparticles : Status, challenges, and opportunities. *Coord. Chem. Rev. J.* **374**, 133–152 (2018).
83. Kim, I., Joachim, E., Choi, H. & Kevin, K. K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 1–10 (2015) doi:10.1016/j.nano.2015.03.004.
84. Schuh, R. S., Baldo, G. & Teixeira, H. F. Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Drug Deliv.* **13**, 1709–1718 (2016).

85. Aguilera-Segura, S. M. *et al.* Advances in Computational Biology Proceedings of the 2nd Colombian Congress on Computational Biology and Bioinformatics (CCBCOL). in *Escherichia coli's OmpA as Biosurfactant for Cosmetic Industry: Stability Analysis and Experimental Validation Based on Molecular Simulations* 265–272 (2014). doi:10.1007/978-3-319-01568-2.
86. Shafqat, S. S. *et al.* Development of amino-functionalized silica nanoparticles for efficient and rapid removal of COD from pre-treated palm oil effluent. *J. Mater. Res. Technol.* **8**, 385–395 (2019).
87. Hermanson, G. T. Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. in *Bioconjugate Techniques* 734 (2013).
88. Hermanson, G. T. PEGylation and Synthetic Polymer Modification. in *Bioconjugate Techniques* 786–838 (2013).
89. Levi-Polyachenko, N. H., Carroll, D. L. & Stewart, J. H. Applications of Carbon-Based Nanomaterials for Drug Delivery in Oncology. in *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes* (eds. Cataldo, F. & Milani, P.) 225 (2008).
90. Pautsch, A. & Schulz, G. E. High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.* **298**, 273–282 (2000).
91. Ravelo-Nieto, E., Duarte-Ruiz, A., Reyes, L. H. & Cruz, J. C. Synthesis and Characterization of a Fullerenol Derivative for Potential Biological Applications. *Mater. Proc.* **4**, 15 (2020).
92. De Santiago, H. A., Gupta, S. K. & Mao, Y. On high purity fullerenol obtained by combined dialysis and freeze-drying method with its morphostructural transition and photoluminescence. *Sep. Purif. Technol.* **210**, 927–934 (2019).
93. Potter, T. M., Neun, B. W., Ilinskaya, A. N. & Obrovolskaia, M. A. Detection of Bacterial Contamination in Nanoparticle Formulations by Agar Plate Test. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 19–22 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7352-1.
94. Muñoz-Camargo, C. *et al.* Unveiling the multifaceted mechanisms of antibacterial activity of buforin II and frenatin 2.3S peptides from skin micro-organs of the orinoco lime treefrog (*Sphaenorhynchus lacteus*). *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
95. Potter, T. M. *et al.* In Vitro Assessment of Nanoparticle Effects on Blood Coagulation. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 103–124 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7352-1.
96. Lopez-barbosa, N. *et al.* Multifunctional magnetite nanoparticles to enable delivery of siRNA for the potential treatment of Alzheimer ' s. *Drug Deliv.* **27**, 864–875 (2020).
97. Meerloo, J. van., Kaspers, G. J. L. & Jacqueline, C. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (ed. Cree, I. A.) 237–

- 245 (Humana Press, 2011). doi:10.1007/978-1-61779-080-5.
98. Balakrishnan, V., Ab Wab, H. A., Abdul Razak, K. & Shamsuddin, S. In vitro evaluation of cytotoxicity of colloidal amorphous silica nanoparticles designed for drug delivery on human cell lines. *J. Nanomater.* **2013**, (2013).
 99. Rahman, I. A., Vejayakumaran, P., Sipaut, C. S., Ismail, J. & Chee, C. K. Size-dependent physicochemical and optical properties of silica nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **114**, 328–332 (2009).
 100. Azarshin, S., Moghadasi, J. & A Aboosadi, Z. Surface functionalization of silica nanoparticles to improve the performance of water flooding in oil wet reservoirs. *Energy Explor. Exploit.* **35**, 685–697 (2017).
 101. Holder, C. F. & Schaak, R. E. Tutorial on Powder X-ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials. *ACS Nano* **13**, 7359–7365 (2019).
 102. Cullity, B. . & Stock, S. . Diffraction III: Real Samples. in *Elements of X-ray diffraction* 171–189 (2014).
 103. Pretsch, E., Bühlmann, P. & Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data. Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data* (2009). doi:10.1007/978-3-540-93810-1.
 104. Tatulian, S. A. Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy. in *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 177–2018 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-275-9_9.
 105. Guleria, A. *et al.* PEGylated Silicon oxide nanocomposites with blue photoluminescence prepared by a rapid electron-beam irradiation approach: applications in IFE-based Cr (VI) sensing and cell-imaging. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **640**, 128483 (2022).
 106. Alizadeh, L. *et al.* AS1411 aptamer-functionalized chitosan-silica nanoparticles for targeted delivery of epigallocatechin gallate to the SKOV-3 ovarian cancer cell lines. *J. Nanoparticle Res.* **22**, (2020).
 107. Rangel-Muñoz, N., González-Barrios, A. F., Pradilla, D., Osma, J. F. & Cruz, J. C. Novel bionanocompounds: Outer membrane protein a and lacasse co-immobilized on magnetite nanoparticles for produced water treatment. *Nanomaterials* **10**, 1–22 (2020).
 108. Lin, Z., Wu, Y. & Bi, Y. Rapid synthesis of SiO₂ by ultrasonic-assisted Stober method as controlled and pH-sensitive drug delivery. *J Nanopart Res* **20**, 304 (2018).
 109. Ren, G., Su, H. & Wang, S. The combined method to synthesis silica nanoparticle by Stöber process. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* (2020) doi:10.1007/s10971-020-05322-y.

110. Li, L. *et al.* Unexpected Size Effect: The Interplay between Different- Sized Nanoparticles in Their Cellular Uptake. *Small* **15**, 1–8 (2019).
111. Chenthamara, D. *et al.* Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater. Res.* **23**, 1–29 (2019).
112. Price, G. & Patel., D. A. Drug Bioavailability. *StatPearls* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557852/> (2020).
113. Shnoudeh, A. J. *et al.* Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. in *Biomaterials and Bionanotechnology* (ed. Inc, E.) 527–611 (2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>.
114. Kunc, F. *et al.* Quantification of surface functional groups on silica nanoparticles: Comparison of thermogravimetric analysis and quantitative NMR. *Analyst* **144**, 5589–5599 (2019).
115. Alan, B. O., Barisik, M. & Ozcelik, H. G. Roughness Effects on the Surface Charge Properties of Silica Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **124**, 7274–7286 (2020).
116. Niu, Y. *et al.* Synthesis of silica nanoparticles with controllable surface roughness for therapeutic protein delivery. *J. Mater. Chem. B* **3**, (2015).
117. Martínez Bonilla, C. A., Torres Flóres, M.-H., Molina Velasco, D. R. & Kouznetsov, V. V. Surface characterization of thiol ligands on CdTe quantum dots analysis by ¹H NMR and DOSY. *New J. Chem.* **43**, 8452 (2019).
118. Potter, T. M., Neun, B. W., Ilinskaya, A. N. & Marina A, D. Detection of Bacterial Contamination in Nanoparticle Formulations by Agar Plate Test. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 19–22 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7352-1.
119. Soares, S., Sousa, J., Pais, A. & Vitorino, C. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. *Front. Chem.* **6**, 1–15 (2018).
120. International Organization for Standardization. *ISO 10993-5:2009(E) Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 1–34 (2009).
121. Neun, B. W., Ilinskaya, A. N. & Dobrovolskaia, M. A. Updated Method for In Vitro Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed. McNeil, S. E.) 91–102 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7352.
122. Dunn, K. W., Kamocka, M. M. & McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **300**, 723–742 (2011).
123. Adler, J. & Parmryd, I. Quantifying colocalization by correlation: The pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytom. Part A* **77**, 733–742 (2010).
124. Ajje, H. *et al.* Characterization of the soluble all-carbon molecules C60 and C70. *J.*

- Phys. Chem.* **94**, 8630–8633 (1990).
125. W. Krätschmer, Lowell D. Lamb, K. F. & D. R. H. Solid C60: A new form of carbon. *Nature* **347**, 354–358 (1990).
 126. Brant, J. A., Labille, J., Robichaud, C. O. & Wiesner, M. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release. *J. Colloid Interface Sci.* **314**, 281–288 (2007).
 127. Goswami, T. H., Singh, R., Alam, S. & Mathur, G. N. Thermal analysis: A unique method to estimate the number of substituents in fullerene derivatives. *Thermochim. Acta* **419**, 97–104 (2004).
 128. Hermanson, G. T. Antibody Modification and Conjugation. in *Bioconjugate Techniques* 879 (2013).
 129. Podolsky, N. E. *et al.* Physico-chemical properties of C 60 (OH) 22–24 water solutions: Density, viscosity, refraction index, isobaric heat capacity and antioxidant activity. *J. Mol. Liq.* **278**, 342–355 (2019).
 130. Zhuravlev, L. . Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir* **3**, 316–318 (1987).
 131. Babij, N. R. *et al.* NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry. *Org. Process Res. Dev.* **20**, 661–667 (2016).
 132. Kunc, F. *et al.* Quantification and Stability Determination of Surface Amine Groups on Silica Nanoparticles Using Solution NMR. *Anal. Chem.* **90**, 13322–13330 (2018).