



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

“Papel de la formación de la corona de proteínas en la biodistribución de nanopartículas de SiO₂ bioconjugadas con polietilenglicol y transferrina”

TESIS

Que presenta

M. en C. Silvia Aidee Solorio Rodríguez

**Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
TOXICOLOGÍA**

Directoras de la Tesis:

Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruiz

Dra. Claudia María García Cuellar

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la co-tutoría de la Dra. Andrea M.G. De Vizcaya Ruiz y de la Dra. Claudia M. García Cuellar.

Este trabajo está dedicado a:

Mis padres, Ricardo y Silvia

Mis hermanos, Víctor y Luis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 262008 otorgada durante cuatro años.

Agradezco a la Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz y a la Dra. Claudia García Cuellar por la oportunidad de trabajar con ellas, por su apoyo, confianza y orientación durante mi formación y en el desarrollo de esta tesis.

Al comité de revisión de esta tesis, conformado por la Dra. Patricia García, el Dr. Jorge Tiburcio Báez, el Dr. Adolfo Sierra y el Dr. Olivier Barbier por sus aportaciones en el desarrollo y escritura de la misma.

A la Biol. Marisela Uribe por toda su ayuda y apoyo en el laboratorio. Así como a su gran compañerismo y guía durante estos años.

Al Dr. Vicente Escamilla Rivera por su colaboración y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Aarón Rojas del Departamento de Química del Cinvestav por su ayuda en la realización del análisis termogravimétrico.

Al Dr. Robert Winkler del Departamento de Biotecnología y Bioquímica Cinvestav-Irapuato por su colaboración para la obtención de los resultados de proteómica obtenidos por nanoLC-MS/MS. Agradezco también el gran apoyo en el procesamiento de las muestras por parte de Alicia Chagolla del Cinvestav-Irapuato. Al Dr. Ismael Sánchez Osorio por el apoyo con el uso de LAICBIO.

A la Maestra Lorena Elizabeth Campos Villegas y a su auxiliar Sandra Guadalupe Oliver Anaya del laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental-Centro

Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo del Instituto Politécnico Nacional (CIEMAD-IPN) en apoyo por la realización de las digestiones y cuantificación de silicio en las muestras biológicas.

Al Laboratorio Nacional de Nanoscopía Electrónica del Cinvestav, en especial al Dr. Daniel Bahena Uribe y al Dr. Jorge Roque De La Puente, por el apoyo en la microscopía electrónica.

Al Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Gamaliel Aztatzi, a la Biol. Marisela Uribe y a la Biol. Verónica Montesinos en el desarrollo del estudio *in vivo*.

A mis compañeros del laboratorio 26: Xochiquetzal, Russell, Vicente y Gerardo, por su compañía y apoyo.

Un gran agradecimiento al Colegio de Profesores y al personal administrativo del Departamento de Toxicología.

Agradecimiento al Cinvestav por las becas de apoyo otorgadas para asistencia a congresos y obtención de grado.

A mis padres y hermanos por su cariño, comprensión y ejemplo de entrega a sus labores, quienes me han apoyado para cumplir mis metas.

Al cariño, comprensión y apoyo de Justino.

Gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir esta experiencia.

ÍNDICE GENERAL

Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Nanomateriales.....	1
1.1.1 Aplicación de las nanopartículas en nanomedicina.	1
1.2 Nanopartículas desarrolladas para la terapia contra el cáncer.	4
1.2.1 Terapia pasiva.....	4
1.2.2 Terapia activa.....	4
1.3 Nanopartículas inorgánicas en nanomedicina.....	6
1.4 Nanopartículas de SiO ₂	7
1.4.1 Toxicocinética de las nanopartículas.....	7
1.4.2 Biodistribución y eliminación de las nanopartículas de SiO ₂	9
1.4.3 La transferrina como molécula de bioconjugación.	9
1.5 Corona de proteínas.....	10
1.5.1 Formación de la corona de proteínas.	12
1.5.2 El polietilenglicol como recubrimiento estándar para las nanopartículas.....	13
1.5.3 Internalización de nanopartículas de SiO ₂	14
1.6 Toxicidad de las nanopartículas de SiO ₂	15
1.7 El traslado de los estudios preclínicos a la clínica.....	17
1.8 JUSTIFICACIÓN.....	18
1.9 HIPÓTESIS.....	19
1.10 OBJETIVOS.....	19
1.10.1 Objetivo general.	19
1.10.2 Objetivos particulares.....	19
2 MÉTODOS	20
2.1 Diseño del estudio.	21
2.2 Síntesis de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.....	24
2.2.1 Síntesis de las nanopartículas de SiO ₂	25
2.2.2 Aminación de las nanopartículas de SiO ₂	25
2.2.3 Funcionalización de las nanopartículas de SiO ₂	26
2.3 Caracterización de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas por microscopía electrónica de transmisión.	27
2.4 Caracterización de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas por microscopía electrónica de barrido.....	27
2.5 Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.	28
2.6 Cuantificación de proteína en las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.....	29
2.7 Determinación de endotoxina en las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.	29
2.8 Caracterización de las dispersiones de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.	30
2.9 Obtención de plasma humano.....	31
2.10 Obtención de plasma de ratón.....	32
2.11 Formación e identificación de la corona de proteínas.	32

2.12	Análisis de proteómica.....	34
2.13	Modelo de xenotransplante y tratamientos con las nanopartículas.....	34
2.14	Digestión de muestras biológicas.....	35
2.15	Cuantificación por espectrometría de absorción atómica.....	36
2.16	Análisis de resultados.....	37
3	RESULTADOS.....	38
3.1	Síntesis y caracterización de las nanopartículas de SiO ₂	38
3.1.1	Tamaño primario y composición química de las nanopartículas de SiO ₂ ..	38
3.1.2	Diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las nanopartículas de SiO ₂ ...	41
3.2	Funcionalización de las nanopartículas de SiO ₂	44
3.2.1	Aminación de las nanopartículas de SiO ₂	44
3.2.2	Análisis de termogravimetría de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.....	46
3.2.3	Cuantificación de transferrina en las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	48
3.2.4	Diámetro hidrodinámico de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	50
3.2.5	Contenido de endotoxina de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	50
3.3	Formación de la corona de proteínas.....	51
3.3.1	Corona de proteínas de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	52
3.3.2	Perfil de la corona de proteínas de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	53
3.3.3	Procesos biológicos asociados al perfil de la corona de proteínas.....	53
3.3.4	Perfil de la corona de proteínas formada en plasma de humano y de ratón.....	54
3.4	Cuantificación por espectrometría de absorción atómica.....	59
4	DISCUSIÓN.....	67
4.1	Síntesis y caracterización de las nanopartículas de SiO ₂	67
4.2	Funcionalización de las nanopartículas de SiO ₂	68
4.3	Formación de la corona de proteínas.....	69
4.4	Perfil de la corona de proteínas y su relevancia en nanomedicina.....	72
4.5	Diferencias inter-especie en el plasma humano y de ratón.....	74
4.6	Biodistribución de las nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas.....	78
5	CONCLUSIONES.....	82
6	PERSPECTIVAS.....	83
7	BIBLIOGRAFÍA.....	84
8	APÉNDICE.....	93
9	ANEXOS.....	99

Lista de figuras

Figura 1. Ventajas del uso de NP como liberadores de fármacos en comparación con los fármacos libres en la terapia contra el cáncer.....	2
Figura 2. Esquema de las estrategias de marcaje de las células en los tratamientos clínicos	5
Figura 3. Ejemplos de NP inorgánicas en la nanomedicina	6
Figura 4. Esquema que representa el modelo de la corona de proteínas que puede ser subdividido en un componente duro y uno suave.	11
Figura 5. El recubrimiento con polietilenglicol reduce la captura de NP por el sistema fagocítico mononuclear.	14
Figura 6. Esquema representativo de la pérdida de la especificidad de NP de SiO ₂ Tf en la presencia de proteínas del SFB.....	15
Figura 7. Ruta de administración para nanomedicinas que se utilizan en la terapia activa y pasiva contra el cáncer	17
Figura 8. Esquema de la síntesis de las NP de SiO ₂ -PEG-Tf.....	24
Figura 9. Tamaño primario de las NP de SiO ₂	39
Figura 10. Distribución de tamaño de las NP de SiO ₂	39
Figura 11. Imágenes de SEM de las NP de SiO ₂	40
Figura 12. Composición elemental de las NP de SiO ₂	41
Figura 13. Gráfica representativa de la distribución de diámetro hidrodinámico de las NP de SiO ₂	42
Figura 14. Gráfica del PI de las NP de SiO ₂ . Se midió el potencial zeta de las NP sin aminorar en agua con diferentes pH	45
Figura 15. Gráfica del PI de las NP de SiO ₂ aminadas.....	45
Figura 16. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	47
Figura 17. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de las NP funcionalizadas.....	47
Figura 18. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de la transferrina.....	48

Figura 19. Análisis de la CP de las NP por electroforesis en gel	51
Figura 20. Análisis de la CP formada en plasma humano y de ratón en las NP funcionalizadas por electroforesis en gel.....	52
Figura 21. Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas identificadas en la CP en plasma humano (CPH) y de ratón (CPR).	53
Figura 22. Red de procesos biológicos implicados en el perfil de la CP en plasma humano	56
Figura 23. Red de procesos biológicos implicados en el perfil de la CP en plasma de ratón.....	56
Figura 24. Abundancia relativa de las proteínas encontradas en los perfiles de la A)CPH y B)CPR de las NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	58
Figura 25. Crecimiento del tumor en un modelo de xenotransplante en ratones NU/NU con células A549.....	59
Figura 26. Concentración de Si en sangre (µg/L)	61
Figura 27. Concentración de Si en pulmón e hígado (µg/g).....	62
Figura 28. Concentración de Si en bazo y tumor (µg/g).....	63
Figura 29. Concentración de Si en órganos y sangre en ppm	64
Figura 30. Proporción relativa de Si en el pulmón, el hígado, el bazo y el tumor después de la administración de NP de SiO ₂ sin funcionalizar.....	65
Figura 31. Proporción relativa de Si en el pulmón, el hígado, el bazo y el tumor después de la administración de NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	66

Lista de tablas

Tabla 1. NP aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) de acuerdo al tipo y uso.....	3
Tabla 2. Diámetro hidrodinámico y PDI de NP de SiO ₂ en suspensión en agua.	43
Tabla 3. Potencial zeta de las dispersiones de las NP de SiO ₂ en agua.	43
Tabla 4. Cuantificación de proteína en la suspensión de las NP de SiO ₂ y NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	49
Tabla 5. Concentración de proteína en la suspensión de NP de SiO ₂ funcionalizadas.....	49
Tabla 6. Diámetro hidrodinámico de las NP de SiO ₂ -PEG-Tf.	50
Tabla 7. Lista de proteínas comunes en el perfil de la CP en plasma humano y de ratón.....	55
Tabla 8. Comparación de los procesos biológicos asociadas al perfil de la CP en plasma humano y de ratón.	57
Tabla 9. Concentración de Si en sangre y órganos.	60

Abreviaturas

BCA	Ácido Bicinconínico
CP	Corona de proteínas
CPH	Corona de proteínas en plasma humano
CPR	Corona de proteínas en plasma de ratón
DH	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz (<i>Dynamic light scattering</i> , por sus siglas en inglés)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium, por sus siglas en inglés
EDS	Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (<i>Energy dispersive x-ray spectroscopy</i> , por sus siglas en inglés)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administración</i> , FDA, por sus siglas en inglés)
LDE	Electroforesis láser tipo Doppler (<i>Laser doppler electrophoresis</i> , por sus siglas en inglés)
NP	Nanopartículas
PEG	Polietilenglicol
PI	Punto isoeléctrico
PDI	Índice de polidispersión (<i>Polydispersity index</i> , por sus siglas en inglés)
PBS	Amortiguador de fosfatos salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i> , por sus siglas en inglés)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas en inglés
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning electron microscopy</i> , por sus siglas en inglés)
SFB	Suero fetal bovino

STEM	Microscopía electrónica de transmisión en modo de barrido (<i>Scanning transmission electron microscopy</i> , por sus siglas en inglés)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission electron microscopy</i> , por sus siglas en inglés)
TGA	Análisis de termogravimetría (<i>Thermogravimetric analysis</i> , por sus siglas en inglés)
Tf	Transferrina

Resumen

Las nanopartículas de dióxido de silicio son consideradas como acarreadores de medicamentos de gran interés para ser utilizados en la terapia activa contra el cáncer debido a su versátil funcionalización con moléculas tales como el polietilenglicol y la transferrina. Sin embargo, se ha sugerido que una vez que las NP se encuentran en los fluidos biológicos, éstas son recubiertas por proteínas del suero, confiriéndoles una identidad biológica específica, llamada corona de proteínas, que podría interactuar con el ambiente celular y generar respuestas biológicas no deseadas. Un evento biológicamente relevante que usualmente es ignorado en la formación de la corona de proteínas son las diferencias inter-especie, las cuales pueden ser un factor en las discrepancias encontradas entre los estudios preclínicos y los clínicos. El objetivo de este estudio fue evaluar la formación de la corona de proteínas de nanopartículas de SiO₂ bioconjugadas con polietilenglicol y transferrina y su biodistribución en un modelo de xenotransplante. Para lograr este objetivo, las nanopartículas de SiO₂ fueron sintetizadas, funcionalizadas con polietilenglicol y transferrina, y caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión y barrido, análisis termogravimétrico, y el ensayo de ácido bicinconínico. Posteriormente, la corona de proteínas fue formada en plasma humano o de ratón y las proteínas fueron identificadas por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. El modelo de xenotransplante se estableció al desarrollar tumores en ratones NU/NU con células A549, dichos animales fueron administrados con NP de SiO₂ sin funcionalizar o NP de SiO₂ funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 h. La cantidad de silicio en sangre, pulmón, hígado, bazo y tumor fue determinada por espectroscopía de absorción atómica. Se obtuvieron NP de SiO₂ con un tamaño primario de 26 ± 0.64 nm y su funcionalización fue corroborada mediante el análisis de termogravimetría, el cual mostró una pérdida de masa del 35% a 290°C y 415°C, que corresponde a la presencia de compuestos orgánicos (PEG y Tf). El contenido de Tf fue de 57.48 ± 6.83 µg prot/mg de nanopartículas. El análisis de proteómica mostró diferencias inter-especies en el perfil de la corona de proteínas. Las proteínas más abundantes encontradas en la corona de proteínas de plasma humano fueron inmunoglobulinas, actina citoplasmática 1, serotransferrina, ficolina 3, complemento C3 y apolipoproteína A-1. En contraste, se encontró inhibidor de proteasa serina A3K, serotransferrina, alfa-1-antitripsina y fibrinógeno en mayor abundancia en la corona de proteínas formada en plasma de ratón. La biodistribución de las NP de SiO₂ y NP de SiO₂ funcionalizadas fue comparada. En sangre, a las 4 h, la cantidad de Si cuantificado en los animales tratados con NP de SiO₂ fue de 310.67 ± 142.87 µg/L, mientras que con NP de SiO₂ funcionalizadas la concentración fue de 534.23 ± 152.97 µg/L, con una tendencia a disminuir de manera tiempo dependiente a las 12 y 24 h. En ambos tratamientos, el pulmón fue el órgano que tuvo la concentración más alta de Si a las 4 h en comparación con el grupo control, 17.5 (0.536 - 23.88) µg/g en NP de SiO₂ y 10.60 (1.832 - 18.17) µg/g en NP de SiO₂ funcionalizadas, misma que disminuyó a través del tiempo. A las 24 h, se observó una mayor cantidad de Si en hígado con el tratamiento de NP de SiO₂, 1.048 (0.727 - 6.177) µg/g, en comparación con el tratamiento de NP funcionalizadas, donde fue mayor (0.87 ± 0.26 µg/g), con respecto al control. Este trabajo contribuye con el hallazgo de las diferencias inter-especie que pueden modificar la formación de la corona de proteínas, diferencias que necesitan ser incluidas en los estudios de nanotoxicología con la finalidad de mejorar la interpretación de los resultados preclínicos y los hallazgos clínicos en el diseño de nanomedicamentos más eficientes y seguros. Se requiere ampliar los estudios para determinar la biodistribución y las respuestas toxicológicas de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas a dosis repetidas en el mismo modelo de xenotransplante, ya que se observa una distribución más eficiente cuando las NP están funcionalizadas lo que permitiría dirigir más eficientemente los tratamientos.

Abstract

Silicon dioxide nanoparticles are promising drug carriers against cancer given their versatile functionalization with polyethylene glycol and proteins such as transferrin, which provides active targeting to tumor cells. However, it has been suggested that once in biological fluids serum proteins cover NP and form a biological identity that could interact within cellular environment and be responsible for unexpected biological responses, the so-called protein corona. A relevant biological event that is usually ignored in protein corona formation is the interspecies differences, which can be a factor on the discrepancies reported in preclinical studies vs. clinical treatments. The aim of this study was to evaluate the protein corona formation of SiO₂ nanoparticles functionalized with polyethylene glycol and transferrin and their biodistribution in a xenotransplant model. To achieve this objective, functionalized SiO₂ nanoparticles were synthesized and characterized by transmission and scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis, and bicinchoninic acid assay. Then, protein corona was formed with human or mouse plasma and proteins were identified by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The xenotransplant model was established in NU/NU mouse with A549 cells, the animals were administrated with SiO₂ nanoparticles or functionalized SiO₂ nanoparticles and sacrificed at 4, 12 and 24 h. The quantification of Si in blood, lungs, liver, spleen and tumor was performed by atomic absorption spectroscopy. SiO₂ nanoparticles were obtained with a primary size of 26 ± 0.64 nm and after the functionalization process thermogravimetric analysis showed important mass loss (35%) at 290°C and 415°C corresponding to the degradation of polyethylene glycol and transferrin. In addition, transferrin content was determined to be 57.48 ± 6.83 µg prot/mg of nanoparticles. Proteomic analysis showed interspecies differences in protein corona profile. The most abundant proteins found in human protein corona were immunoglobulins, actin cytoplasmic 1, serotransferrin, ficolin-3, complement C3, and apolipoprotein A-1. Meanwhile, mouse protein corona showed serine protease inhibitor A3K, serotransferrin, alpha-1-antitrypsin and fibrinogen. Moreover, the biodistribution of SiO₂ nanoparticles and functionalized SiO₂ nanoparticles was compared, in tumor-induced animals. In blood at 4 h, the concentration of Si in SiO₂ nanoparticles treatment was 310.67 ± 142.87 µg/L, meanwhile, blood from animals treated with functionalized SiO₂ nanoparticles showed a higher concentration of Si at 4 h (534 ± 152.97 µg/g) which decreased over time. In both treatments, lung was the organ with the highest concentration of Si at 4 h respect to control, 17.5 (0.536-23.88) µg/g in SiO₂ nanoparticles and 10.60 (1.832-18.17) µg/g in functionalized SiO₂ nanoparticles, which decreased over time. At 24 h, the concentration of Si in liver, 1.048 (0.727-6.177) µg/g in SiO₂ nanoparticle treatment was higher than functionalized SiO₂ nanoparticle treatment, meanwhile in tumor the concentration of Si in functionalized SiO₂ nanoparticles was higher respect to control (0.87 ± 0.26 µg/g). Our study indicates that interspecies differences need to be included in nanotoxicological studies to fill the gap between preclinical results and clinical outcomes in order to design more efficient and safer nanomedicines. Further studies are needed to determine the biodistribution and the toxicological responses related to protein corona profile of functionalized SiO₂ nanoparticles at repeated doses in the same xenotransplant model, given the clear differences observed and the possibility of a directionality of nanoparticles in active anticancer therapy.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Nanomateriales.

La nanotecnología manipula y aplica partículas manufacturadas que miden entre 1 y 100 nm en al menos una dimensión denominados como nanomateriales (National Nanotechnology Initiative, The Royal Society, 2004) con propiedades fisicoquímicas únicas atribuibles a su tamaño nanométrico, composición química, solubilidad, forma y propiedades de agregación o aglomeración (Nel et al., 2006). Estos NM pueden clasificarse de acuerdo a su número de dimensiones en escala nanométrica en: recubrimientos, nanotubos o nanopartículas (NP), con una, dos o tres dimensiones, respectivamente. Las NP a su vez pueden ser sintetizadas en base a metales (NP de oro, plata, quantum dots, óxidos metálicos tales como el óxido de titanio, cobre, hierro, silicio y bismuto, carbono (nanotubos, nanocables, fullerenos) o ser de origen biológico (liposomas y virus) (Card et al., 2018). Debido a sus propiedades únicas, las NP se están utilizando en la creación de productos con diversas aplicaciones tales como la producción de cosméticos, bloqueadores solares, alimentos, pinturas, electrónicos, ropa deportiva y en la liberación de fármacos e imagenología en el área de la nanomedicina (Maynard, 2012).

1.1.1 Aplicación de las nanopartículas en nanomedicina.

La nanomedicina se refiere a la aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, diagnóstico, monitoreo y control en sistemas biológicos para diversas enfermedades, especialmente el cáncer, siendo el principal objetivo desarrollar terapias y diagnósticos más seguros y eficaces (Liu et al., 2007). El uso de las NP en esta área confiere ciertas ventajas frente a la medicina tradicional, ya que el compuesto quimioterapéutico puede ser encapsulado, unido o absorbido en las NP, lo que puede incrementar su solubilidad, reducir la dosis y los posibles efectos secundarios o colaterales (Figura 1) (Alexis et al., 2010).

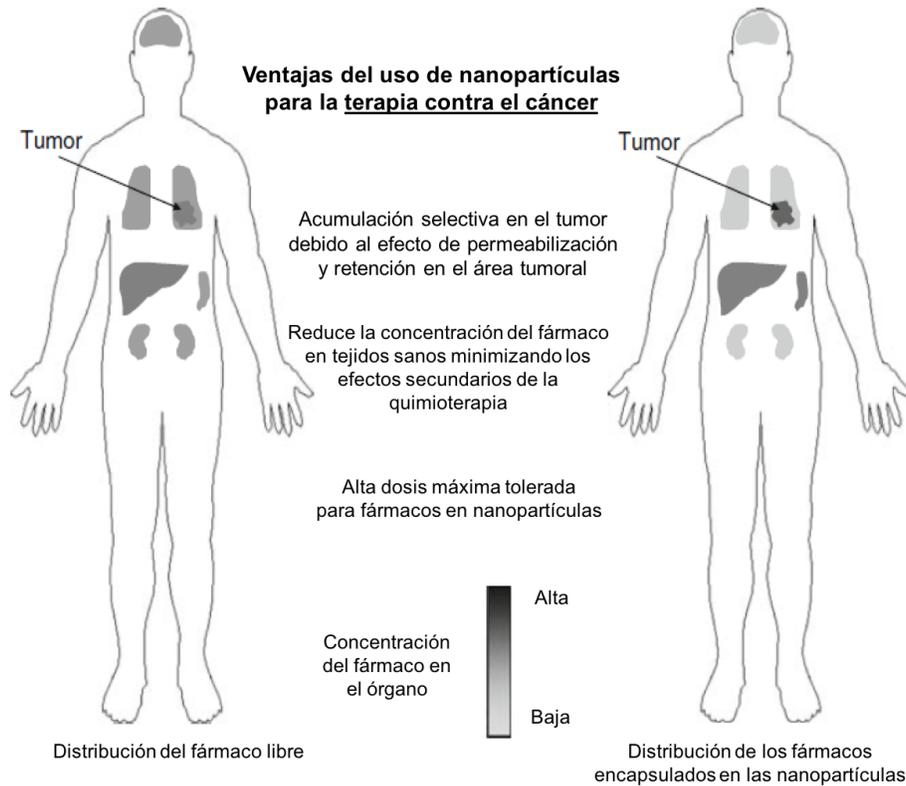


Figura 1. Ventajas del uso de NP como liberadores de fármacos en comparación con los fármacos libres en la terapia contra el cáncer. (Modificado de Alexis et al., 2010).

Para que un fármaco llegue a su destino exitosamente debe: 1) cruzar una o varias membranas biológicas (ej. mucosa, epitelio, endotelio), 2) pasar a través de la membrana plasmática y 3) ganar el acceso a un organelo (Hillaireau y Couvreur, 2009). Por lo tanto, para lograr que las NP lleguen a su destino exitosamente es indispensable entender su biodistribución e internalización de acuerdo a sus propiedades, de tal manera que a través de su diseño, éstas sean modificadas para un ingreso específico y seguro. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado el uso de algunas NP liposomales y poliméricas hasta el momento bioconjugadas con polietilenglicol (PEG) (Jin et al., 2014) (Tabla 1), sin embargo, los efectos secundarios desde inmediatos a tardíos, tales como hipersensibilidad, trombocitopenia, neuropatía o leucemias, se siguen observando, debido a la rápida liberación del fármaco de estas NP (Szebeni et al., 2011; Szebeni et al., 2012). En relación a los costos, si

comparamos las NP contra la medicina tradicional, el costo es más elevado en las NP. Por ejemplo, en el 2009, el costo por dosis del Doxil era de 5594 dólares en comparación con la doxorubicina (62-162 dólares) (Goldberg et al., 2013). En la actualidad el Doxil (10 ml) puede costar 1,234 dólares en comparación con la doxorubicina de 30 dólares ("Drugs", 2018). Por lo cual se siguen desarrollando nuevas NP que sean más eficaces y seguras.

Tabla 1. NP aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) de acuerdo al tipo y uso.

NP	Fármaco	Compañía	Composición	Indicaciones	Adm.
Liposomas	AmBisome	Gilead Sciences	Anfotericina B liposomal	Infecciones fúngicas y de protozoos	I.V.
	Doxil/ Caelyx	Ortho Biotech, Schering-Ploug	Doxorubicina- PEG liposomal	Sarcoma de Kaposi's, cáncer de mama y cáncer de ovario metastásicos	I.V.
	Myocet	Zeneus	Doxorubicina liposomal	Cáncer de mama metastásico	I.V.
Polímeros	Adagen	Enzon	Adenosina desaminasa- PEG	Inmunodeficiencia severa combinada asociada a deficiencia ADA	I.M.
	Macugen	OSI Pharmaceuticals	PEG-anti- VEGF aptámero	Degeneración macular asociada con la edad	I.R.
	Oncaspar	Enzon	Pegaspargasa (PEG-L- asparaginasa)	Leucemia linfoblástica aguda	I.V. I.M.
	Somavert	Nektar, Pfizer	PEG-HGF	Acromegalia	S.C.
Otros	Abraxane	Abraxis, BioScience, AstraZeneca	Paclitaxel unido a albúmina	Cáncer de mama metastásico	I.V.
	Feridex	Bayer Healthcare Pharmaceuticals	Óxido de hierro superpara- magnético	Agente de contraste MRI	I.V.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, PEG, polietilenglicol, HGF, Factor de crecimiento hepatocito. ADA, adenosina desaminasa, I.V. intravenoso, I.R. intravítrea, I.M. intramuscular, S.C. subcutáneos. (Tomado de Jin et al., 2014).

El diseño de las NP se realiza con el objetivo de controlar la liberación del fármaco de manera sostenida a través del tiempo o de manera única en el sitio blanco con la ayuda de recubrimientos (principalmente polímeros) y moléculas de anclaje. Las moléculas de anclaje para los procesos de bioconjugación ayudan para que la internalización de las NP en tejidos sea más específica a través de interacciones ligando-receptor mientras que los recubrimientos aumentan el tiempo de circulación media de las NP e influyen en su biodistribución (Moghimi et al., 2001)

1.2 Nanopartículas desarrolladas para la terapia contra el cáncer.

1.2.1 Terapia pasiva.

En la terapia contra el cáncer se ha desarrollado la terapia pasiva y activa (Figura 2) (Jin et al., 2014). En el tratamiento pasivo las NP inyectadas por vía intravenosa son transportadas por la circulación sanguínea hacia su destino, en donde por el efecto de retención y permeabilización vascular se acumulan en tumores. Sin embargo, la mayoría de las NP administradas por vía sistémica alcanzan otros órganos, en particular el hígado, el bazo y los pulmones (Tran et al., 2017).

1.2.2 Terapia activa.

Para hacer mucho más específica la terapia contra el cáncer, se ha desarrollado la terapia activa en la cual se busca anclar o unir diversas moléculas a las NP tales como anticuerpos, lectinas, proteínas, hormonas o moléculas de peso molecular pequeño (Berry y Curtis, 2003; Tran et al., 2017) con el fin de que sean reconocidas por sitios específicos en la superficie de células tumorales, y de esta manera dirigir la internalización de las NP hacia una vía de endocitosis celular específica. El Abraxane®, aprobado por la FDA, es un buen ejemplo de la aplicación de las NP en la terapia activa, que ya ha sido aprobada para el tratamiento contra el cáncer pancreático metastásico, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de mama (National Cancer Institute, 2013). Este tratamiento está compuesto por el fármaco antineoplásico Paclitaxel unido a albúmina, proteína que se une al receptor gp60 que se encuentra en la superficie de las células endoteliales. Al unirse a este

receptor, el complejo puede transitar por caveolas hacia el sitio tumoral en donde se acumulan al unirse a la proteína SPARC sintetizada por las células tumorales (Desai, 2008). No obstante, se ha observado que estos tratamientos no son más eficaces que los medicamentos tradicionales ni más seguros ya que se siguen presentando efectos secundarios tales como neutropenia, trombocitopenia, fiebre, hipersensibilidad y neuropatía periférica.

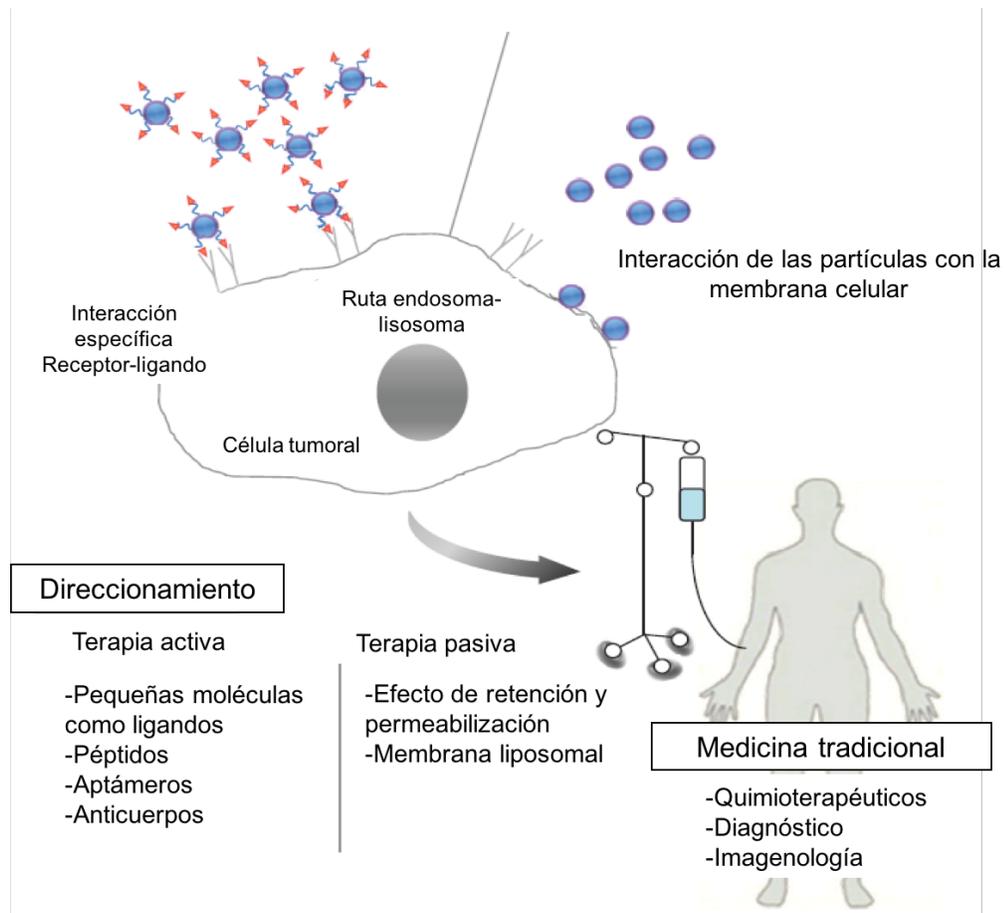


Figura 2. Esquema de las estrategias de marcaje de las células en los tratamientos clínicos. (Modificado de Jin et al., 2014).

1.3 Nanopartículas inorgánicas en nanomedicina.

Las principales NP orgánicas utilizadas en la nanomedicina son de tipo liposomal. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estas NP no han logrado ser tan eficaces en comparación con los tratamientos tradicionales debido a su baja estabilidad estructural al estar bajo el flujo de la circulación lo que conlleva a la rápida liberación del fármaco. Por ello, surgen como alternativas prometedoras NP inorgánicas tales como NP de oro, quantum dots, NP de óxido de silicio y óxido de hierro, nanotubos de carbono, entre otras (Figura 3) (Tang y Cheng, 2013). Para éstas surgen diversas moléculas para su biconjugación como el folato, la transferrina (Tf), anticuerpos o lectinas. Estas moléculas son buenas candidatas ya que son reconocidas por receptores que se encuentran en la membrana de las células tumorales en mayor proporción que en las células normales (Kim y Nie, 2005).

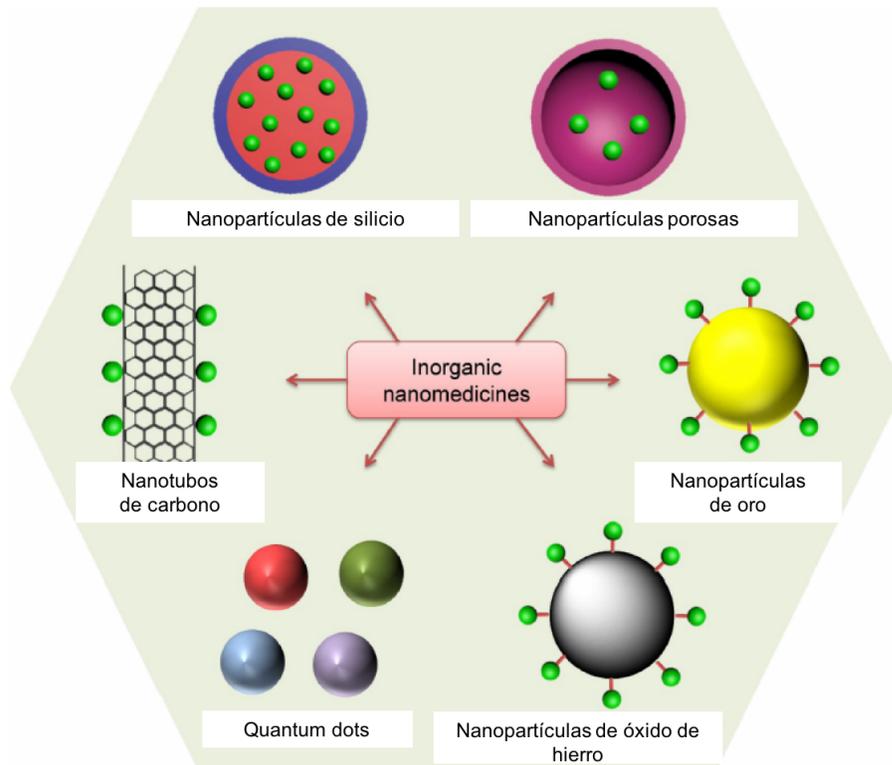


Figura 3. Ejemplos de NP inorgánicas en la nanomedicina. (Modificado de Tang y Cheng). 2013.

1.4 Nanopartículas de SiO₂.

Entre las diversas NP inorgánicas, las NP de SiO₂ con estructura amorfa han llamado la atención en la nanomedicina debido a su bajo costo, alta eficiencia en la carga de fármacos, facilidad para modificar su superficie (grupos hidroxilo, amino, tiol y carboxilo) y son consideradas hasta el momento como una de las NP más biocompatibles (Napierska et al., 2010; Hu et al., 2011). En el 2014, la FDA aprobó por primera vez la evaluación del uso de NP de SiO₂ no porosa para su uso en imagenología en un estudio clínico en humanos, lo cual indica su gran potencial como nanomedicina (Phillips et al., 2014).

1.4.1 Toxicocinética de las nanopartículas.

En la terapia contra el cáncer la principal vía de administración de las NP es la intravenosa. Una vez en el torrente sanguíneo, la distribución de éstas dependerá de sus propiedades fisicoquímicas (tamaño y superficie principalmente), de la unión de las NP con proteínas plasmáticas y de la irrigación de cada uno de los órganos (Landsiedel et al., 2012). En general, se ha observado que las NP con menor tamaño poseen una amplia distribución en comparación con aquellas que tienen mayor tamaño. Sin embargo, el ingreso de las NP en un tejido dependerá de la capacidad de las NP para atravesar los poros en los capilares endoteliales continuos, fenestrados o sinusoidales. De tal manera que, en tejidos con capilares fenestrados (ej. riñón, mucosa digestiva y glándulas) el paso de las NP es mucho más factible si las NP tienen un tamaño alrededor de 60 nm; NP con tamaños de 50 a 100 nm pueden atravesar endotelio discontinuo (hígado, bazo y médula ósea), mientras que para el hígado, el bazo y el tumor es el endotelio es más accesible a la internalización de las NP debido a la presencia de fenestras tanto en el endotelio como en la membrana basal del capilar, siendo el sistema nervioso central una de las regiones que tiene mayor restricción a las NP ya que sólo permite el ingreso de moléculas con tamaños de 400-500 Da. Sin embargo, se ha observado que la endocitosis mediada por caveolas o clatrin podría dar lugar a la internalización de

NP con tamaños de 60 a 120 nm en el sistema nervioso central de NP recubiertas con apolipoproteína E (Landsiedel et al., 2012).

La unión a proteínas es otro factor que influye en la distribución de las NP. Se ha observado que la adsorción de opsoninas (inmunoglobulinas, factores de complemento y fibrinógeno) en la superficie de las NP promueve la internalización en macrófagos, mientras que la adsorción de diapsoninas (albúmina, apolipoproteína A-I, A-IV, C-III y H) pueden reducir la fagocitosis de las NP *in vitro*. La fagocitosis de las NP se lleva a cabo principalmente en el sistema fagocítico mononuclear, el cual se encuentra en circulación sanguínea y en tejidos. Las células que lo conforman son monocitos y macrófagos en tejido conectivo, órganos linfoides, hígado, bazo, médula ósea y hueso. Las células fagocíticas pueden reconocer a la NP a través de la fracción constante de las inmunoglobulinas G y de los receptores C3 en su superficie y favorecer la acumulación de las NP en dichos órganos. Este proceso juega un papel muy importante en la respuesta inmune ya que algunas enfermedades autoinmunes se han asociado con anomalías en la fagocitosis (Landsiedel et al., 2012). La circulación sanguínea a los tejidos también es un factor en la biodistribución de las NP. Es decir, el ingreso de las NP es más probable para órganos altamente irrigados como el pulmón, hígado, corazón y riñón (Li et al., 2010). Las NP no se metabolizan y algunas son consideradas biopersistentes (Landsiedel et al., 2012). Sin embargo, algunas NP pueden sufrir un proceso de degradación dependiendo del ambiente en el cual se encuentren, especialmente en los organelos intracelulares con pH ácido como los lisosomas. De igual forma, los recubrimientos que se encuentra en su superficie podrían sufrir un proceso de degradación intracelular en el compartimento endosomal dependiente de catepsinas (Sée et al., 2009; Landsiedel et al., 2012).

La principal vía de eliminación de las NP es la renal, aunque se han propuesto otras vías de excreción como la biliar, a través de la leche materna y el sudor. Para que las NP sean eliminadas por el riñón deben ser filtradas en el glomérulo o secretadas en los túbulos. Para ser filtradas en el glomérulo las NP se enfrentan al endotelio

fenestrado (70-90 nm), la membrana basal glomerular (estructura de malla con poros de 2 a 8 nm) y el epitelio con aberturas de 4 a 11 nm en las extensiones de los podocitos. Debido a estas características del glomérulo se ha propuesto que NP con diámetros hidrodinámicos menores a 6 nm y con carga positiva serán más fáciles de excretarse por esta vía (Li et al., 2010; Liu et al., 2013).

1.4.2 Biodistribución y eliminación de las nanopartículas de SiO₂.

Estudios han demostrado que las NP de SiO₂ se biodistribuyen a pulmón, hígado y bazo principalmente. NP de SiO₂ de 20 nm fueron administradas vía intravenosa a ratones ICR (Institute of Cancer Research) con una dosis única de 10 mg/Kg, encontrando NP en pulmón, hígado y bazo. No obstante, la concentración de Si en hígado y bazo disminuyó tiempo dependiente durante los 30 días posteriores a la administración (Xie et al., 2010). Las NP de SiO₂ (45 nm) con diferentes superficies (OH-SiNP, COOH-SiNP y PEG-SiNP) mostraron diferente biodistribución en ratones Balb/c-nu en una administración única de 30 mg/Kg vía intravenosa. Las PEG-SiNP presentaron mayor tiempo en circulación sanguínea (3 h) en comparación con las OH-SiNP y COOH-SiNP (1.3 y 0.5 h, respectivamente), así como fueron retenidas en menor proporción en el hígado y el bazo. Las tres NP fueron eliminadas vía renal (He et al., 2008). NP de SiO₂ de 150 nm administradas vía intravenosa en ratas Wistar a una dosis de 2 mg/Kg se observó la eliminación vía urinaria a las 12 h (1.2%), 72 h (14.4%) y 96 h (36%). La principal acumulación se presentó en pulmones y riñón (Borak et al., 2012). En administraciones orales, NP de Si se han acumulado en hígado, pulmón, bazo y riñón en ratas Sprague Dawley a una exposición única de 500 y 1000 mg/Kg. La proporción de Si eliminado fue mayor en las heces (15-80%) en comparación con la eliminación vía urinaria (7-8%) (Lee et al., 2014).

1.4.3 La transferrina como molécula de bioconjugación.

La Tf es una proteína candidata para dirigir la internalización de las NP en células cancerosas debido a que éstas sobre-expresan al receptor de Tf 1, conocido también como CD71 (Ming et al., 2002). Este receptor está expresado de manera ubicua en

bajos niveles en tejido normal, y su homólogo el receptor de Tf 2 se encuentra normalmente en tejido hepático e intestino delgado. Aunque también se ha demostrado la presencia del receptor de transferrina 2 en células tumorales, la Tf tiene mucho mayor afinidad por el receptor de Tf 1 (Daniels et al., 2006; Daniels et al., 2012). Algunos vehículos para fármacos han sido conjugados con esta proteína (liposomas, polímeros y NP poliméricas) así como algunos compuestos quimioterapéuticos como la doxorubicina, el cisplatino, el clorambucil y la mitomicina. Se ha observado mayor citotoxicidad en células tumorales con estos complejos, y en aquellos que se encuentran en fases clínicas tempranas, tales como el cisplatino-Tf, se han observado menos efectos adversos en comparación con el fármaco libre (Head et al., 1997). Sin embargo es poco conocido el comportamiento de las NP inorgánicas ancladas a este ligando.

1.5 Corona de proteínas.

Cuando las NP se encuentran en un ambiente fisiológico su superficie es recubierta por proteínas, formando una capa dura y una capa suave, con proteínas fuerte y débilmente unidas respectivamente, que pueden disociarse de acuerdo a su afinidad (Figura 4). A este recubrimiento se le conoce como “corona de proteínas” (CP) y es el complejo que está en primer contacto con las células (Lynch y Dawson, 2008). Esta unión puede alterar el tamaño, estado de agregación y otras propiedades confiriéndole una identidad biológica distinta a su identidad sintética que puede ser determinante para la respuesta fisiológica a través de las interacciones con biomoléculas o membranas celulares (Nel et al., 2009; Walkey y Chan, 2012).

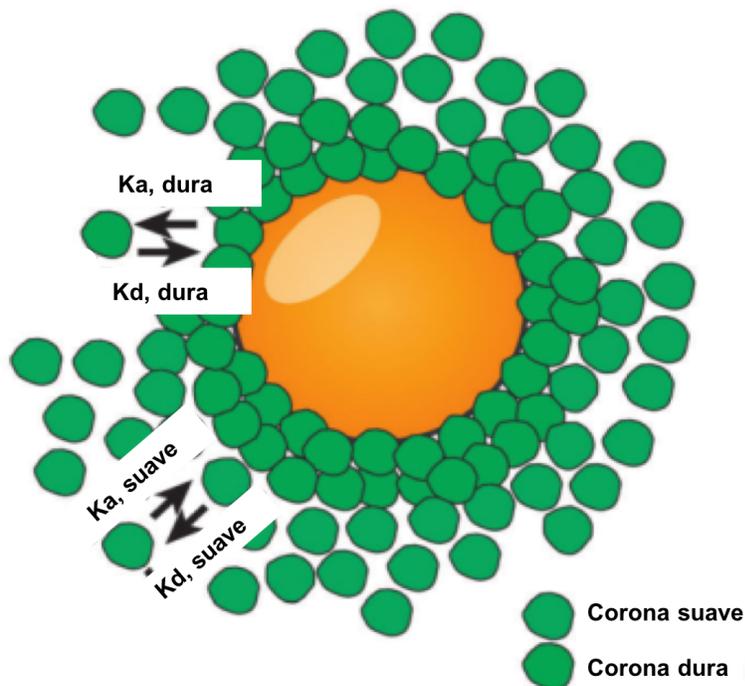


Figura 4. Esquema que representa el modelo de la corona de proteínas que puede ser subdividido en un componente duro y uno suave. K_a constante de asociación, K_d constante de disociación. (Modificado de Walkey y Chan, 2012).

Para NP administradas por vía intravenosa, la sangre es el principal compartimento, por lo tanto, las diversas proteínas que contiene el plasma podrían controlar el acceso de las NP a otros compartimentos. Aunque la composición de la CP depende de las propiedades fisicoquímicas de las NP, existen al parecer dos generalidades: 1) Se han identificado 125 proteínas en la corona en al menos un nanomaterial (conjunto conocido como “adsorboma”) involucradas en el transporte de lípidos, coagulación, activación del complemento, reconocimiento de patógenos y transporte de iones (apolipoproteínas, fibrinógeno, complemento C3, inmunoglobulinas, transferrina, albúmina y clusterina); 2) La CP parece seguir una estructura general, con proteínas adsorbidas en gran abundancia y algunas más adsorbidas con menor abundancia (Walkey y Chan, 2012).

Los factores que pueden afectar la composición, el grosor y la conformación de la corona de proteínas son el tamaño, forma, solubilidad, hidrofobicidad y carga (Izak-Nau et al., 2013; Rahman et al., 2013). Por ejemplo, el grado de hidrofobicidad parece incrementar la abundancia de las proteínas unidas a NP copoliméricas (Cedervall et al., 2007), mientras que en NP de Fe₃O₄ de 30, 200 y 400 nm, se ha demostrado que el tamaño juega también un papel importante tanto en la composición como en la abundancia de las proteínas (Hu et al., 2014).

Como se ha dicho anteriormente, la unión de ciertas proteínas puede tener un efecto directo en la distribución e internalización de las NP, así como en las respuestas fisiológicas. Por ejemplo, la adsorción específica a ciertas proteínas, como son las apolipoproteínas, puede permitir el paso de NP de poli(butilcianoacrilato) a través de las células endoteliales para llegar al cerebro (Kim et al., 2007; Kreuter et al., 2007). En contraste, la adsorción no específica de proteínas puede causar efectos adversos tales como la activación del complemento, coagulación, activación plaquetaria y reacciones inmunológicas (Wu et al., 2009). Estas respuestas fisiológicas, pueden ser inducidas debido a los cambios en la conformación de proteínas y a la exposición de nuevos epítopes (Nel et al., 2009).

1.5.1 Formación de la corona de proteínas.

Los factores que influyen en la formación de la CP son diversos tales como las propiedades fisicoquímicas de las NP y los fluidos biológicos. Recientemente, algunos estudios han reportado una influencia sobre el medio con proteínas utilizado para la formación de la CP. Por ejemplo, NP de ácido poliacrílico de hierro y de silicio han mostrado un perfil de la CP diferente cuando son dispersadas en diversos medios como el amortiguador de fosfatos salino (PBS), solución 0.9% de cloruro de sodio y medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Strojan et al., 2017). Además, se ha reportado que el tipo de medio de cultivo, como el medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) o RPMI, puede influir en la composición de la CP en NP de oro recubiertos con citrato (Maiorano et al., 2010). Por otra parte, el uso de suero o plasma, así como el uso de diferentes anticoagulantes influye en la

formación de la CP y en la internalización de NP de silicio (Mirshafiee et al., 2015; Schöttler et al., 2016). En NP recubiertas con plasma proveniente de pacientes con diferentes enfermedades genera distintos tipos de perfiles (Hajipour et al., 2014) y dicha diferencia se ve reflejada en diferentes respuestas celulares (Hajipour et al., 2015).

1.5.2 El polietilenglicol como recubrimiento estándar para las nanopartículas.

Hasta el momento, la mayoría de los fármacos utilizados en nanomedicina que se encuentran en el mercado o en ensayos clínicos avanzados están bioconjugados con PEG, un polímero no iónico, compuesto de unidades repetidas de etilenglicol, que posee cadenas flexibles que permiten la estabilización estérica, la cual se produce por las interacciones entre las cadenas del polímero. Las cadenas de PEG contienen monómeros repetidos que son reportados como PEG40, es decir 40 repeticiones de etilenglicol o con el peso molecular como PEG 2,000 Da. Para bioconjugar moléculas pequeñas y oligos se utilizan PEG de 20,000 a 50,000 Da con el fin de prevenir la excreción vía renal y mantener una alta concentración por periodos prolongados, mientras que para NP de 50-100 nm se utilizan PEG más pequeños debido a que PEG largos puede incrementar el diámetro hidrodinámico (Jokerst et al., 2011).

La función de los recubrimientos es principalmente evitar la formación de agregados por estabilización estérica, disminuir la adsorción de opsoninas y, por lo tanto el atrapamiento de las NP en el sistema fagocítico mononuclear, lo cual aumenta la probabilidad de que las NP lleguen al sitio blanco antes de ser endocitadas por los macrófagos logrando que el tiempo de vida media en circulación sea mayor (Knop et al., 2010) (Figura 5). También la alta solubilidad del PEG en agua ayuda a que éste sirva de molécula de transporte para fármacos hidrofóbicos (Knop et al., 2010).

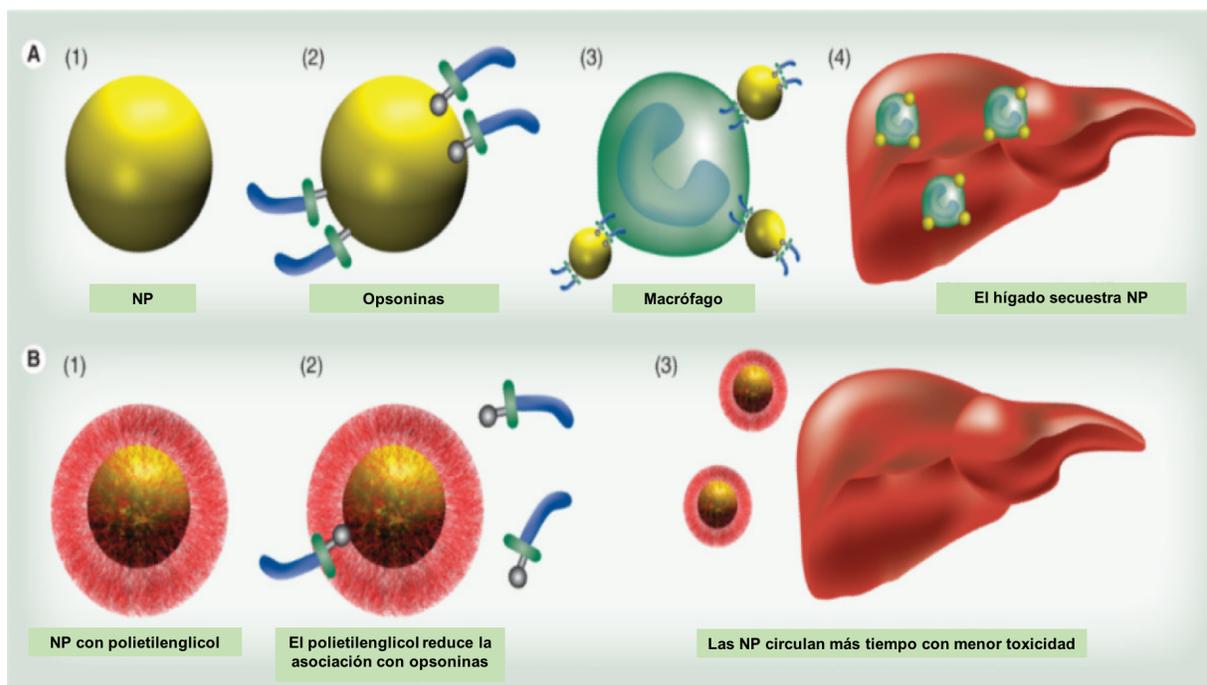


Figura 5. El recubrimiento con polietilenglicol reduce la captura de NP por el sistema fagocítico mononuclear. (A1) Nanopartículas (A2) recubiertas con opsoninas y (A3) asociadas con macrófagos (A4) para ser llevadas al hígado, en donde los macrófagos residentes en el hígado (células de Kupffer) tratan de eliminar a las NP. El recubrimiento con PEG (B1) previene la opsonización (B2) y disminuye la acumulación en el hígado de las NP (B3), lo cual incrementa la disponibilidad de éstas (Modificado de Jokerst et al., 2011).

La función del PEG dependerá del peso molecular, de la densidad de cadenas de superficie y de la conformación de la misma de acuerdo a la superficie de la NP, por lo tanto, aunque presenta diversas ventajas, principalmente la disminución en la adsorción de proteínas, el recubrimiento con este polímero no excluye totalmente la adsorción de éstas (Knop et al., 2010; Park et al., 2014).

1.5.3 Internalización de nanopartículas de SiO₂.

En estudios *in vitro* la presencia de suero fetal bovino (SFB) ha disminuido la internalización de NP de SiO₂ bioconjugadas con Tf en células A549 (Lesniak et al., 2012; Salvati et al., 2013) y el ingreso de NP de Fe₃O₄ en células MEF (fibroblastos de ratón), HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano), MCF-7 (adenocarcinoma de

mama humano) y HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) (Bajaj et al., 2009), con respecto a la exposición de dichas NP sin la presencia de SFB. Esto indica que los componentes del SFB pueden provocar una menor interacción con la membrana celular, y por lo tanto, afectar también la especificidad de NP bioconjugadas (Figura 6).

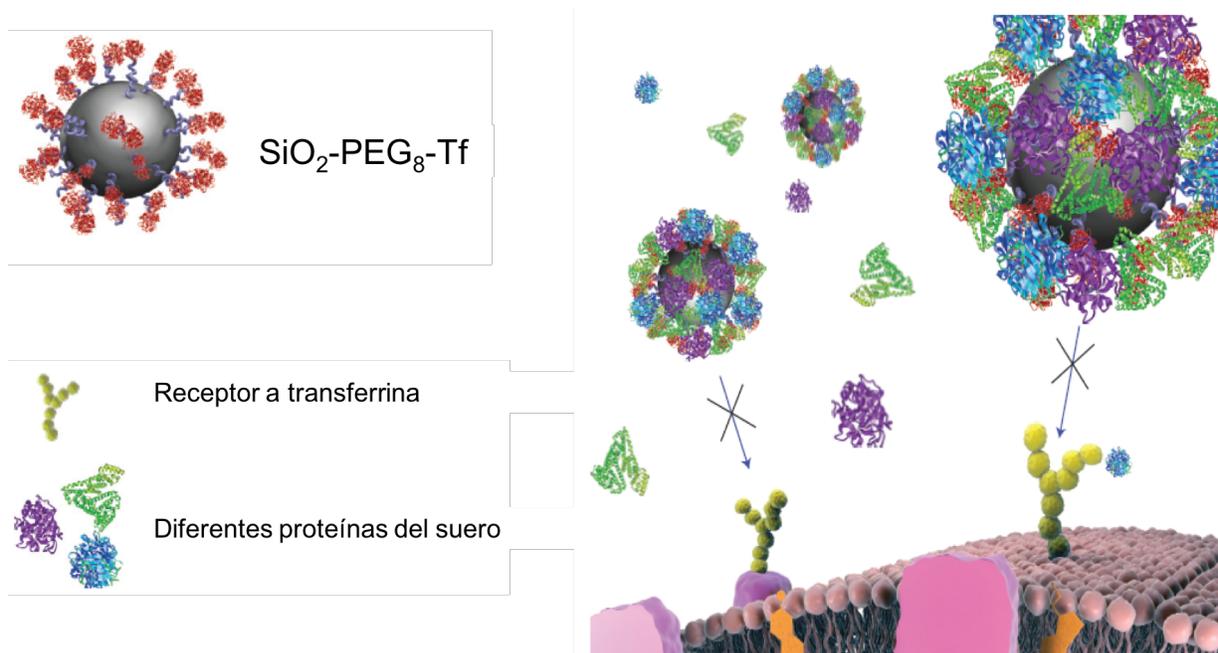


Figura 6. Esquema representativo de la pérdida de la especificidad de NP de SiO₂Tf en la presencia de proteínas del SFB. (Modificado de Salvati et al., 2013).

Sin embargo, el SFB difiere del plasma humano en composición y por lo tanto no refleja la exposición real, en la cual la célula se enfrenta al complejo NP-proteínas formado en la circulación sanguínea del humano. Las NP de SiO₂-PEG-Tf son de interés en la actualidad para la terapia activa contra el cáncer. Sin embargo, al ser potencialmente tóxicas, la pérdida en su especificidad podría provocar su acumulación en órganos no deseados.

1.6 Toxicidad de las nanopartículas de SiO₂.

Las NP al tener una gran área de superficie son potencialmente reactivas (Donaldson et al., 2004; Oberdörster et al., 2005) los principales mecanismos de toxicidad son la

generación de especies reactivas de oxígeno y la inflamación en células A549 (Lin et al., 2006; Nel et al., 2006; Choi et al., 2009; Sun et al., 2011; Hou et al., 2013). Además de estos dos mecanismos, las NP de SiO₂ han mostrado otros efectos nocivos. En células endoteliales se ha observado la liberación del factor Von Willebrand con formación de fibras ultralargas (Bauer et al., 2011) y en células HepG2 se ha observado su localización dentro del núcleo con proteínas agregadas e inhibición de la replicación, transcripción y proliferación (Chen y Mikecz, 2005). En células HaCaT se ha observado la detención del ciclo celular así como un aumento en la expresión de proteínas del citoesqueleto y chaperonas que están relacionadas con el estrés oxidante (Yang et al., 2010). Estudios realizados anteriormente en el laboratorio muestran una baja citotoxicidad, no mayor al 20%, a 100 µg/ml durante un tiempo máximo de 72 h, aunque si disminuyó el potencial de membrana mitocondrial desde las 12 h. Análisis por TEM mostró la acumulación de NP de SiO₂ en cuerpos lamelares así como grandes cúmulos libres en el citoplasma (hasta 48 h). Lo que nos indica, que aun cuando no se observe citotoxicidad, su alta acumulación podría ocasionar otros efectos más sutiles y así alterar la homeostasis celular (Solorio, 2013).

Por otra parte, estudios *in vivo* en modelos experimentales en rata y ratón han demostrado que la administración de las NP de SiO₂ vía inhalatoria puede causar inflamación severa, incremento de la concentración de fibrinógeno y daño isquémico al miocardio; así como inflamación, trombosis, fibrosis y necrosis en el hígado por administración vía intravenosa (Napierska et al., 2010; Xie et al., 2010). Por lo que, NP de SiO₂, al igual que otros nanomateriales, son potencialmente tóxicas (He et al., 2008; Xie et al., 2010) por lo cual es importante mantener un buen diseño y control en su aplicación en nanomedicina. Aun cuando se ha evaluado la toxicidad de NP de SiO₂, hay pocos estudios de estas NP bioconjugadas (especialmente con transferrina) y no hay información sobre su biodistribución y su potencial tóxico.

1.7 El traslado de los estudios preclínicos a la clínica.

El uso de las NP en los tratamientos para el cáncer no ha alcanzado aún el éxito esperado (Venditto y Szoka, 2013). El número de NP que se encuentran comercialmente es menor al número de NP que se encuentran en desarrollo (Figura 7) (Etheridge et al., 2013).

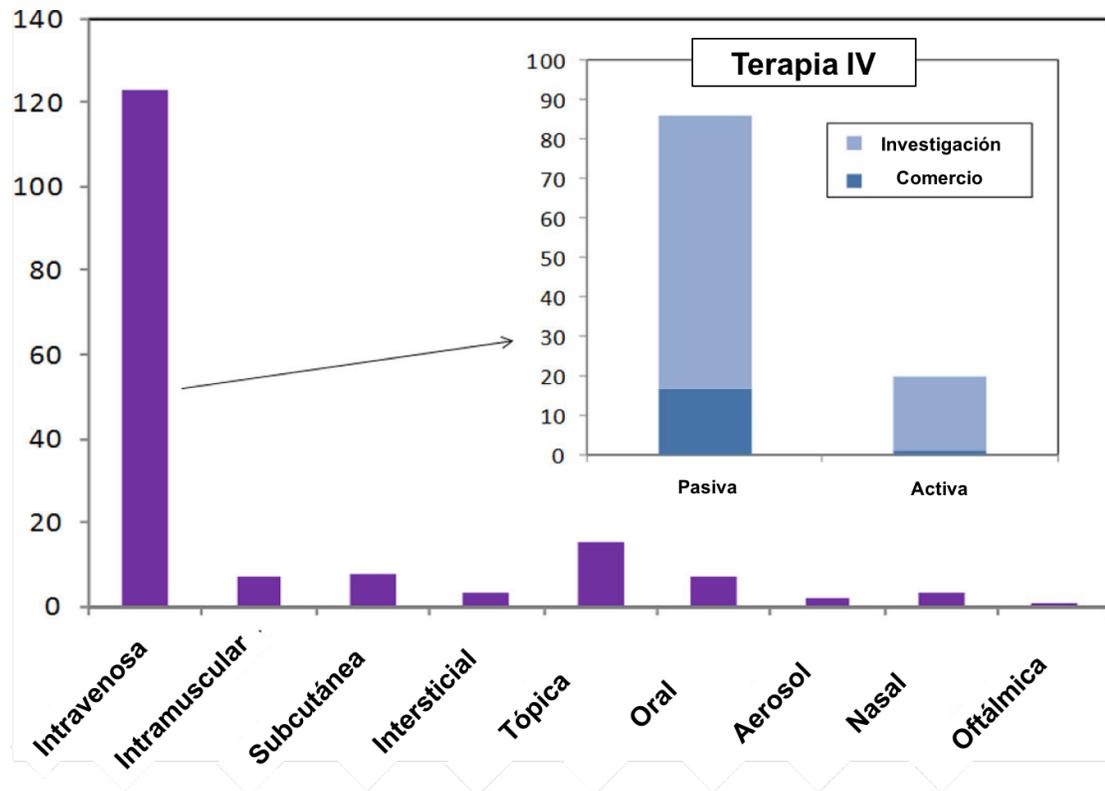


Figura 7. Ruta de administración para nanomedicinas que se utilizan en la terapia activa y pasiva contra el cáncer (Modificado de Etheridge et al., 2013).

Por lo tanto, la mayoría de la información sobre el comportamiento de las NP se basa en modelos animales, principalmente en roedores, y su extrapolación a la clínica aún permanece con muchas incógnitas (Nichols y Han, 2012; Shi et al., 2016). Las nanomedicinas con más éxito son el Doxil® y el Abraxane®. Ambos obtuvieron, en los estudios preclínicos, resultados positivos en cuanto a la eficiencia. Sin embargo, en las fases clínicas se observó una menor eficiencia a la esperada. Su aprobación por la FDA, se basa en la reducción de la toxicidad cuando se administran en dosis elevadas (Nichols y Han, 2012). Se ha propuesto que el desarrollo de las NP para el

uso clínico podría mejorar si se conoce a mayor profundidad su identidad biológica (Caracciolo et al., 2016). Por lo tanto, se propuso evaluar si existen diferencias inter-especie en el perfil de la CP entre humano y ratón, al ser éste último el modelo más estudiado. Así como la biodistribución de las NP de SiO₂ funcionalizadas con PEG y Tf que son de interés como nanoacarreadores.

1.8 JUSTIFICACIÓN.

Las NP de SiO₂ son de gran interés para la nanomedicina debido a su versátil funcionalización con moléculas como el PEG y la Tf, principalmente en la terapia contra el cáncer. Sin embargo, las NP, una vez administradas por vía intravenosa, son rodeadas por proteínas del plasma las cuales les confieren una identidad biológica que podría influir en su internalización y su biodistribución. De manera relevante, se ha propuesto que la CP, al influir en las respuestas biológicas, podría tener un papel importante en las diferentes respuestas encontradas en los estudios preclínicos y clínicos, por lo que resulta relevante caracterizar y evaluar la corona de proteínas en el plasma humano y de ratón, así como determinar si la presencia de la CP influirá en la biodistribución de las NP de SiO₂ con PEG-Tf en un modelo *in vivo*. Determinar las diferencias inter-especie de la CP así como la biodistribución de dichas NP es útil para identificar cuáles de las respuestas observadas en los modelos preclínicos pueden ser trasladados a los estudios clínicos mejorando el desarrollo de estrategias en el diseño, que mantengan la especificidad y control en la interacción entre las NP y el ambiente fisiológico con la finalidad de disminuir posibles efectos adversos.

1.9 HIPÓTESIS.

La formación de la corona de proteínas de NP de SiO₂ bioconjugadas con PEG-Tf será dependiente de la especie y definirá su biodistribución en un modelo *in vivo*.

1.10 OBJETIVOS.

1.10.1 Objetivo general.

Evaluar la formación de la corona de proteínas de NP de SiO₂ bioconjugadas con PEG-Tf y su biodistribución en un modelo *in vivo*.

1.10.2 Objetivos particulares.

- Sintetizar y caracterizar las NP de SiO₂ bioconjugadas con PEG-Tf (SiO₂-PEG-Tf): Determinar el tamaño primario, forma, composición y estructura por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Funcionalizar las NP de SiO₂ con PEG y Tf, y caracterizarlas por análisis de termogravimetría (TGA) y el ensayo de ácido bicinconínico (BCA).
- Determinar el tamaño hidrodinámico y carga de superficie de las NP de SiO₂-PEG-Tf, por dispersión dinámica de luz (DLS) y electroforesis láser tipo doppler (LDE) en PBS y al formar la CP.
- Identificar la composición de la corona de proteínas en plasma (humano y ratón) de NP de SiO₂-PEG-Tf mediante nano cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS).
- Determinar la localización de las NP de SiO₂ y NP de SiO₂-PEG-Tf mediante la cuantificación de silicio en órganos y tumores de ratones NU/NU xenotransplantados con células tumorales.

2 MÉTODOS

Reactivos:

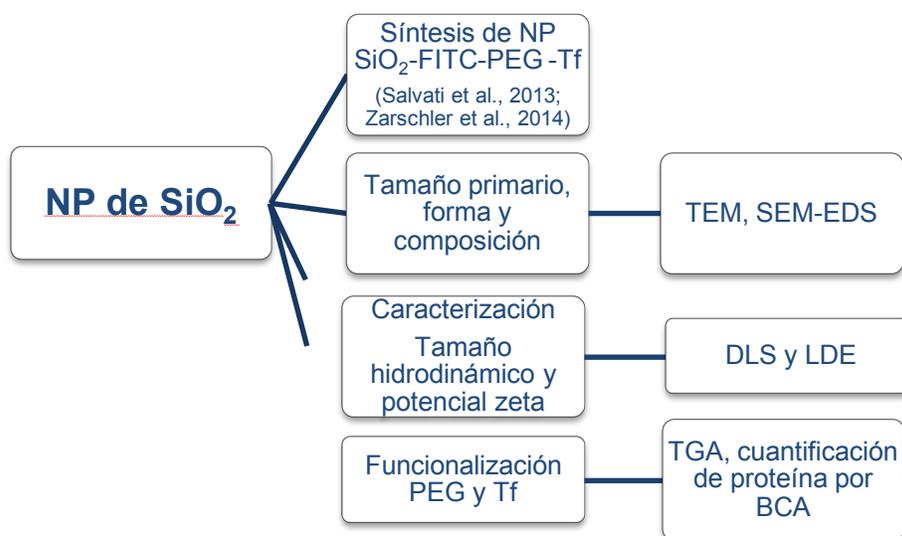
La línea celular de carcinoma alveolar humano A549 fue obtenida del American Type Culture Collection, ATCC (USA). Holo-transferrina humana (T4132), isocianato de fluoresceína isómero I (FITC, F7250), (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS, 281778), tetraetilortosilicato (TEOS, 86578), etanol (459828), hidróxido de amonio (NH_4OH , 338818), dimetilsulfóxido anhidro (DMSO, 276855), etanol anhidro (676829), tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP-HCl, C4706), y medio Ham's F-12 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). PEGSMCC cross-linker (SM[PEG]8, 22108), PEG N-succinimidil S-acetiltioacetato (SAT[PEG]4, 26099), hidroxilamina-HCl (26103), estándar de albúmina de suero bovino (BSA, 23209), ácido etilendiaminotetraacético sal disódica dihidrato (EDTA, 15576028), NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein gels (NP0335BOX), ácido bicinconínico reactivo A (23223) y buffer de carga NuPAGE LDS (NP0007) de Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Columnas de Sephadex G-25 (52130800) de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Azul de Coomassie G-250 coloidal (1610803) de Bio-rad (USA).

2.1 Diseño del estudio.

El estudio consistió en tres etapas que incluyeron la síntesis y caracterización de las NP de SiO₂ con PEG y Tf (a partir de este momento se denominarán NP de SiO₂ funcionalizadas), la formación de la corona de proteínas y la biodistribución de las NP en un modelo de xenotransplante.

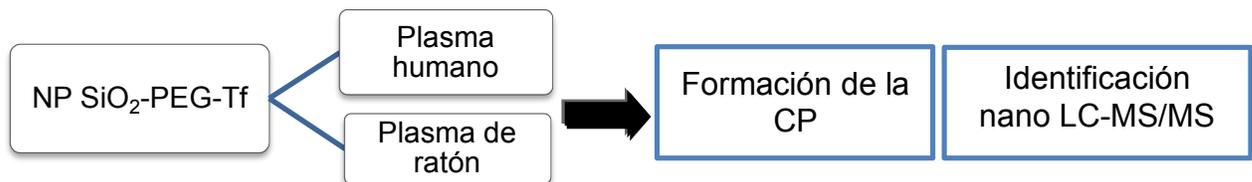
a) Síntesis y caracterización de nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

La síntesis de las NP se realizó con base en dos protocolos de síntesis con fundamento en el método de Stöber y la caracterización de las NP permitió obtener información sobre su tamaño primario, tamaño hidrodinámico y carga. Además, las técnicas de TGA y BCA permitieron determinar la funcionalización de las NP.



b) Formación de la corona de proteínas en nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

Una vez obtenidas las NP de SiO₂ funcionalizadas, éstas fueron incubadas con plasma humano o de ratón para la formación de la CP identificando las proteínas que componen a la CP a través de la técnica nanoLC-MS/MS.

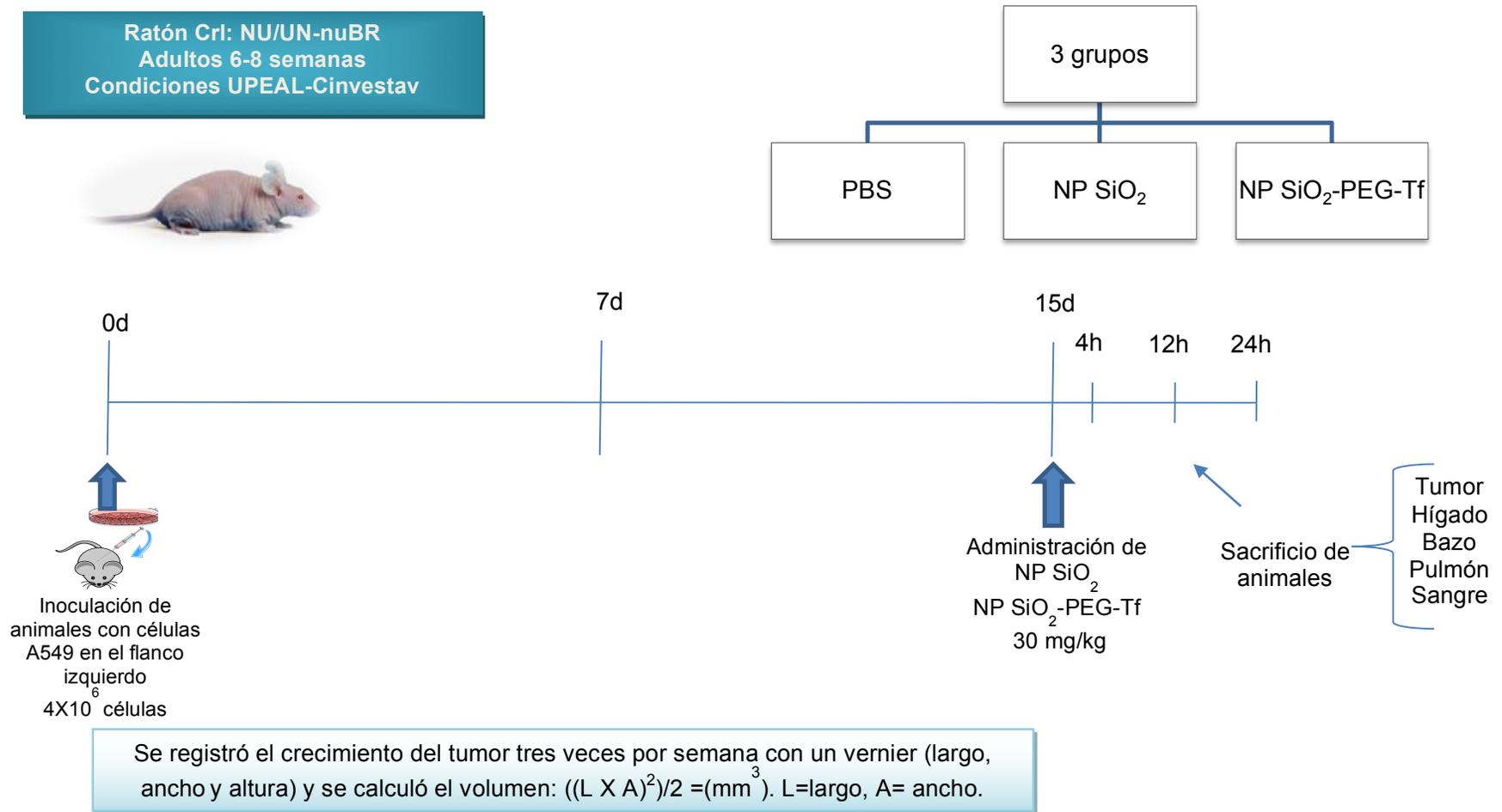


c) Estudio *in vivo*.

Para determinar la biodistribución de las NP se estableció un modelo de xenotransplante en ratones NU/NU con células tumorales A549. Un grupo control y dos grupos experimentales fueron administrados con dos tratamientos, NP sin funcionalizar y NP funcionalizadas, con la finalidad de determinar si la funcionalización y bioconjugación con PEG y Tf permite un mayor ingreso de las NP en el tumor y si la biodistribución es influenciada por la CP *in vivo*. Al no conocer datos de distribución de éstas NP se realizó una cinética de tres tiempos a las 4, 12 y 24 h.

Modelo de xenotransplante

Ratón Crl: NU/UN-nuBR
Adultos 6-8 semanas
Condiciones UPEAL-Cinvestav



2.2 Síntesis de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

Las NP de SiO₂ funcionalizadas fueron sintetizadas de acuerdo al protocolo descrito por Salvati et al., 2013 y Zarschler et al., 2014, en el cual las NP se preparan por el método de Stöber (Stober, 1968) modificado que consiste en la condensación del tetraetilortosilicato con la solución de marcaje N-1-(3-trimetoxisililpropil)-N-fluoresceiltiurea (APTMS-FITC). El FITC es un fluorocromo que queda encapsulado en la NP y que nos podría facilitar la detección por fluorescencia. En este estudio no utilizaremos la fluorescencia para la detección de las NP. Sin embargo, no se eliminará de la síntesis ya que en pruebas preliminares observamos que la solución de APTMS-FITC es importante para la obtención de NP monodispersas. Posteriormente, los grupos hidroxilo en la superficie de la NP son modificados con APTMS para su posterior anclaje con un maleimido PEG enlazador. Este PEG funciona a su vez como anclaje para la proteína transferrina humana a través de un grupo tiol añadido a la proteína con un grupo N-succinimidil S-acetil(tiotetraetilen glicol) (SATPEG₄) (Salvati et al., 2013; Verderio, 2013; Zarschler et al., 2014) (Figura 8).

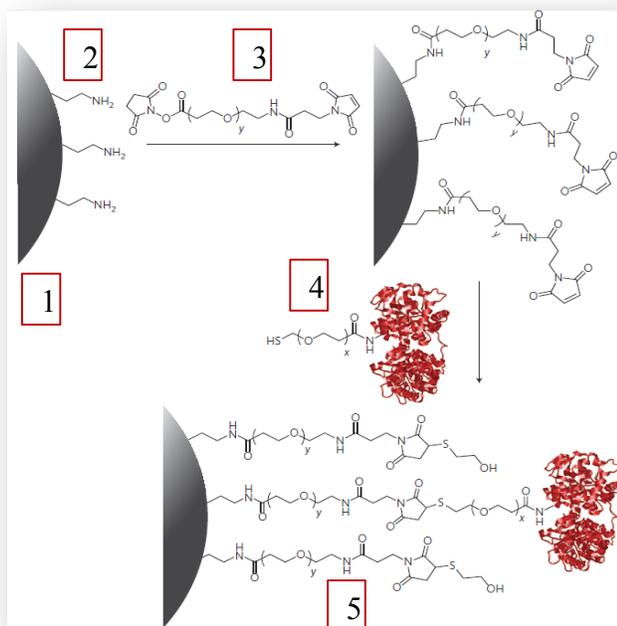


Figura 8. Esquema de la síntesis de las NP de SiO₂-PEG-Tf. 1) NP de SiO₂, 2) Aminación de las NP, 3) PEG₈ maleimido, 4) SATPEG₄ y 5) NP de SiO₂-PEG-Tf. (Tomado de Salvati et al., 2013).

2.2.1 Síntesis de las nanopartículas de SiO₂.

Se preparó la solución de conjugación FITC-APTMS N-1-(3-trimetoxisilpropil)-N-fluoresceiltiurea al disolver 4 mg de FITC en 2 ml de etanol anhidro. Inmediatamente se añadió a esta solución 20 µl de APTMS y se agitó a temperatura ambiente en oscuridad durante 4 h. Se mezcló 25 ml de etanol (99.9%) con 0.91 g de NH₄OH (28-30% NH₃). Con una rápida agitación se agregaron 500 µl de la solución de tinción preparada anteriormente y 15 minutos después se añadió 940 µl de TEOS. La reacción continuó por 20 h en la oscuridad a 25°C a 600 rpm. La suspensión de NP obtenida se centrifugó a 6,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 min para eliminar el exceso de FITC que no reaccionó. El sobrenadante se utilizó para recuperar las NP a 14,000 rpm por 20 minutos, el botón resultante se lavó con etanol con sonicación y posteriormente fue centrifugado. El procedimiento de lavado se repitió dos veces más, seguido de tres veces con agua y fueron finalmente resuspendidas en agua en un volumen de 12 ml (Salvati et al., 2013; Zarschler et al., 2014).

2.2.2 Aminación de las nanopartículas de SiO₂.

Las NP de SiO₂ fueron suspendidas en agua a una concentración de 10 mg/ml. A esta suspensión se añadió ácido acético a una concentración final de 0.05% vol. Posteriormente, el APTMS se agregó a una concentración de 0.1% vol y se sonicó en baño por 1 minuto. La reacción permaneció por 2 h a 400 rpm a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 90°C por 1 hora. Las NP se lavaron con etanol (3 veces) y con agua (2 veces). Finalmente las NP fueron resuspendidas en agua y permanecieron a temperatura ambiente por 16 h antes de la funcionalización. El proceso de aminación fue corroborado por el cambio del punto isoeléctrico (PI) de pH ácido a pH básico (Salvati et al., 2013). El PI se define como el pH en el cual el potencial zeta de la NP es cero y se puede determinar al medir el potencial zeta de la NP en agua a diferentes pH (Suttioponparnit et al., 2011). La determinación se realizó en tres experimentos independientes por triplicado en el equipo Malvern Zetaziser NanoZS90.

2.2.3 Funcionalización de las nanopartículas de SiO₂.

Se disolvieron 5 mg de Tf (por 10 mg de Nanopartículas) en 1 ml de PBS desgasificado (pH 7.4) mediante la técnica de “Freeze-Pump-Thaw”. A dicha solución se añadió SATPEG₄ en dimetilsulfóxido (0.046 μ moles). Después de 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, 100 μ l del amortiguador de desacetilación (0.5M hidroxilamina, 25 mM de ácido etilendiaminotetra acético en PBS pH 7.4) se añadieron a la reacción, la cual continuó por 2 horas. La solución fue purificada en una columna de sephadex G-25 con HEPES pH 7.4 e incubadas durante 5 minutos con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 1 mM (Zarschler et al., 2014).

Las NP aminadas se lavaron dos veces con HEPES 20 mM pH 7.4 por centrifugación y resuspensión a una concentración de 10 mg/ml. Se añadió gota a gota y mezclando un volumen de solución igual de SM-PEG8-Mal 5 mg/ml en HEPES pH 7.4 20 mM. La reacción se agitó por 2 h con sonicación en baño intermitente (2 x 30 segundos). Posteriormente se lavaron con HEPES por centrifugación y resuspensión a 14,000 rpm durante 25 minutos. Finalmente fueron resuspendidas en HEPES a una concentración final de 10 mg/ml de NP (Salvati et al., 2013; Zarschler et al., 2014).

La solución de proteína modificada y la dispersión de NP se terminó simultáneamente para ser combinadas (0.5 mg de proteína/mg NP; 5 mg/ml NP) en una atmósfera de nitrógeno. Se agitaron suavemente por dos h y se incubó durante toda la noche. Se realizaron lavados por centrifugación y resuspensión tres veces en PBS filtrado pH 7.4 para eliminar el exceso de proteína (Zarschler et al., 2014). Posterior a su bioconjugación, se cuantificó la cantidad de proteína por BCA de la NP funcionalizadas restando la absorbancia de las NP de SiO₂-PEG a las NP de SiO₂-PEG-Tf.

2.3 Caracterización de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas por microscopía electrónica de transmisión.

2.3.1 Principio.

En TEM se utiliza un haz de electrones que son acelerados y focalizados en un espécimen para crear una imagen de éste al transformar los datos de incidencia y refracción de los electrones que penetran al espécimen y son dispersados por las estructuras internas (Egerton, 2005). Los microscopios de TEM pueden utilizarse en modo microscopía de barrido (STEM) ya que tienen un detector de electrones secundarios (Ubero, 2009).

2.3.2 Procedimiento.

Para observar las NP por TEM, 30 µl de NP se dispersaron en 500 µl de isopropanol y se sonicó la dispersión durante 15 minutos, finalmente se colocaron 10 µl de la dispersión de NP en rejillas de cobre Lacey Formvar/Carbon. Se tomaron imágenes representativas de las muestras en un microscopio electrónico transmisión de alta resolución (JEM-ARM200F) para determinar la morfología y el tamaño primario. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio Nacional de Microscopía Electrónica de Alta resolución (LANE-Cinvestav). Se contaron 356 NP y su tamaño se midió con ayuda del software Digital Micrograph Versión 2.01.697.0.

2.4 Caracterización de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas por microscopía electrónica de barrido.

2.4.1 Principio.

La técnica de SEM se basa en focalizar electrones que pueden barrer la superficie del espécimen o ir hacia una posición para analizarla y determinar la forma. Tiene diversos detectores para determinar la topografía (electrones retrodispersados), detectores para obtener imágenes de alta resolución (electrones secundarios) y detectores de energía dispersiva (Ubero, 2009). La técnica de espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS) permite cuantificar a los elementos

presentes en la muestra y por lo tanto, identificar posibles contaminantes. Debido a que cada elemento emite rayos X característicos, la técnica se basa en la detección de rayos X que son el resultado de la transición de electrones excitados por el haz primario al regresar a su estado basal o de mínima energía (Goldstein, 2003.).

2.4.2 Procedimiento.

Para visualizarlas en SEM, se colocó 5 μl de la dispersión en una cinta de carbono y se dejó secar la muestra durante toda la noche y con el microscopio Zeiss Auriga se determinó la forma y la composición de las NP. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio Nacional de Microscopía Electrónica de Alta resolución (LANE-Cinvestav) con ayuda del software Digital Micrograph Versión 2.01.697.0.

2.5 Análisis termogravimétrico de las nanopartículas de SiO_2 funcionalizadas.

2.5.1 Principio.

El análisis de TGA es una técnica en la cual se mide la masa de una sustancia en función del tiempo mientras que es sujeta a un cambio controlado de temperatura. Debido a que la masa es una propiedad fundamental de la materia, cualquier cambio en ella es asociado a un cambio químico, que puede reflejar un cambio en su composición (Mansfield et al., 2014). Es decir, la variación de la masa en el transcurso del tiempo, aumentando la temperatura, indicaría la descomposición térmica de la muestra.

2.5.2 Procedimiento.

Las muestras de NP funcionalizadas fueron secadas a temperatura ambiente. El análisis de TGA se llevó a cabo en el equipo de análisis térmico SDT Q600 V20.9 con un cambio de temperatura de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 30°C a 500°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La cantidad de muestra utilizada fue al menos de 1 mg. Como control se analizaron muestras de SiO_2 sin funcionalizar. El procedimiento

se llevó a cabo con la ayuda del Dr. Aarón Rojas del Departamento de Química-Cinvestav.

2.6 Cuantificación de proteína en las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

2.6.1 Principio.

Este ensayo tiene su fundamento en la reducción de iones Cu²⁺ a Cu¹⁺ por la reacción de proteínas con los iones, formando un complejo púrpura entre el Cu¹⁺ con el ácido bicinconínico. Debido a que la producción de iones Cu¹⁺ está en función de la concentración de proteína, la concentración de proteína de las muestras puede ser determinada al comparar la absorción de éstas con estándares. El método es sensible y muestra menos interferencias en comparación con otros compuestos (Smith et al., 1985).

2.6.2 Procedimiento.

Se prepararon estándares (0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml) con albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumine* por sus siglas en inglés) para el gráfico de calibración. Se colocaron 10 µl de cada estándar y muestra sin diluir en una placa de 96 pozos por duplicado. Se añadió 100 µl del reactivo de BCA preparado con CuSO₄ (20µl por cada ml de BCA) y se incubaron durante 60°C por 30 minutos. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 592 nm en el equipo Tecan Infinite 2000. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

2.7 Determinación de endotoxina en las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

2.7.1 Principio.

La endotoxina, también conocido como lipopolisacárido, es el componente de las membranas de las bacterias Gram negativas que estimulan la liberación de citocinas inflamatorias, las cuales pueden causar, en liberación excesiva, daños en múltiples órganos e incluso la muerte. Las endotoxinas son ubicuas y pueden

encontrarse en el material de laboratorio, y son un indicativo de contaminación. Para determinar su concentración se utiliza el ensayo de lisado de amebocitos de limulus, el cual consta de la activación de una cascada de proteasas, en presencia de endotoxinas, las cuales escinden un sustrato cromogénico para generar pNA (para-nitroanilina), el cual puede ser detectado a una longitud de onda de 405 nm. La correlación entre la absorbancia y la concentración de endotoxina es lineal en el rango de 0.1-1.0 EU ml. La concentración de endotoxina de las muestras se calcula con los valores de absorbancia de los estándares (Li y Boraschi, 2017).

2.7.2 Procedimiento.

El ensayo se realizó como lo describe el kit QCL-1000™ Endpoint Chromogenic LAL de Lonza. Las dispersiones de las NP se prepararon a una concentración de 0.5 mg/ml en agua MiliQ en tubos de baja retención estériles.

2.8 Caracterización de las dispersiones de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

2.8.1 Principio.

El diámetro hidrodinámico de una partícula puede ser determinado por dispersión DLS, en la cual un láser se hace incidir sobre la suspensión y la dispersión de la luz se relaciona directamente con el tamaño hidrodinámico de las NP. Este tamaño se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Stetefeld et al., 2016) tomando en consideración la temperatura absoluta y viscosidad del medio. Varios grupos de tamaño pueden estar presentes en la suspensión, por lo cual se grafica en un histograma la distribución en número (Jiang et al., 2009) y se obtiene el índice de polidispersión (PDI) que nos indica si la suspensión de NP es monodispersa o polidispersa (PDI <0.5 ó PDI >0.5, respectivamente), es decir si está presente más de un grupo con diferentes tamaños hidrodinámicos (Landsiedel et al., 2012).

Cuando las NP entran en contacto con un medio acuoso son rodeadas por los iones que están presentes en él formando una doble capa eléctrica compuesta por la capa de Stern, con iones fuertemente adheridos a las NP, que atrae a su vez iones de contracarga para formar la otra capa conocida como difusa. Dentro de ésta última se encuentra un límite teórico que delimita el área, dentro de la cual los iones se mueven junto con la partícula, conocido como potencial zeta. Por lo tanto, este potencial no es la carga de superficie de las NP, sino un estimador de la carga que éstas adquiere en un medio en particular que es de interés práctico como indicador de la estabilidad de la dispersión, ya que determina las fuerzas interpartícula. La técnica LDE es utilizada para medir el potencial zeta. Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de la suspensión de NP, las partículas cargadas se moverán hacia el electrodo con la polaridad opuesta (fenómeno conocido como electroforesis). Si un haz de laser pasa a través de una muestra que experimenta electroforesis, la luz dispersada por el movimiento de las partículas será de una frecuencia desplazada, esta última se utiliza para calcular el potencial zeta a través de la ecuación de Smoluchowski (Sze et al., 2003). Se considera estable una suspensión de NP cuando el potencial zeta se encuentra <30 mV o >30 mV (Jiang et al., 2009).

2.8.2 Procedimiento.

Las NP dispersadas se prepararon de acuerdo al protocolo descrito anteriormente en H₂O-dd, PBS y con CP. Un mililitro de la suspensión fue colocado en la celda para leer el diámetro hidrodinámico y después, esa misma alícuota se utilizó para determinar el potencial zeta en el equipo Zetasizer NanoZS90 de Malvern Instruments Ltd, UK.

2.9 Obtención de plasma humano.

La muestra de plasma humano fue obtenida de individuos sanos por punción venosa con su consentimiento informado. La sangre fue colectada en tubos con EDTA y fue centrifugada a 3,000 rpm por 15 min a 4°C. Las muestras no fueron identificadas, se mezclaron y guardaron en alícuotas a -80°C (Deng et al., 2009).

2.10 Obtención de plasma de ratón.

La sangre fue obtenida de ratones BALB/c por punción venosa en la cola con previa anestesia. Fue recolectada en tubos con EDTA y centrifugada a 3,000 rpm por 15 min a 4°C. Las muestras se mezclaron y guardaron en alícuotas a -80°C (Argmann y Auwerx, 2006). El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio, CICUAL del Cinvestav.

2.11 Formación e identificación de la corona de proteínas.

2.11.1 Principio.

Una vez que las NP han ingresado al organismo pueden ser cubiertas por distintas proteínas del plasma formando lo que se conoce como corona de proteínas. Para formar esta corona, las NP son incubadas en plasma, posteriormente lavadas para eliminar las proteínas de la corona suave y obtener la corona de proteínas dura. Las proteínas se separan en un gel, para posteriormente identificarlas por diversos métodos, de los cuales la nanoLC-MS/MS es la técnica más utilizada (Aggarwal et al., 2009; Deng et al., 2009; Ehrenberg et al., 2009; Lundqvist et al., 2011).

La espectrometría de masas se enfoca en la separación de especies moleculares y atómicas de acuerdo a su masa. La técnica nanoLC-MS/MS es la más confiable para identificar proteínas en donde las muestras, antes de llegar a la fuente de iones del espectrómetro, llegan a un cromatógrafo de líquidos. Una vez que se encuentra en la fuente de iones, se someta a ionización y los fragmentos positivos que se producen se aceleran en vacío a través de un campo magnético distribuyéndose en base a su relación carga/masa (m/z). Finalmente, se analizan los espectros de los fragmentos para reconstruir la molécula original (Fernández-Lainez et al., 2009).

2.11.2 Procedimiento.

Las NP fueron incubadas en plasma humano o de ratón a una concentración de 1.5 mg/ml al 55% de plasma a 37°C durante 30 minutos. Las proteínas no unidas fueron separadas de las NP mediante lavados con PBS-EDTA por centrifugación a 14,000 rpm por 25 minutos a 4°C. Las NP fueron cuidadosamente lavadas con la solución amortiguadora tres veces y separadas de las proteínas al añadir una solución de SDS a una concentración de 2% de SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8. Las muestras se incubaron a 95°C por 5 min y después se separaron por electroforesis en gel (Deng et al., 2009; Ehrenberg et al., 2009; Lundqvist et al., 2011). Las muestras se separaron en geles de SDS-poliacrilamida 4-12%. El gel fue fijado con etanol/ácido acético, lavado una vez con agua y posteriormente teñido con azul de Coomassie coloidal (Ehrenberg et al., 2009). El plasma sin NP fue utilizado como control para asegurar que las proteínas no hayan precipitado.

Después de ser separadas por SDS-PAGE, el gel fue cortado en 15 secciones horizontales y para la extracción de los péptidos los cortes fueron sometidos a reducción, alquilación y digestión (Schevchenko et al., 1996; Schevchenko et al., 2006). Las muestras se analizaron por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem acoplado a ionización por nebulización con analizador de trampa de iones. Los archivos estándar se convirtieron a archivos Proteo Wizard (Kessner et al., 2008) y la búsqueda de las proteínas se realizó con la base de datos Uniprot para *Homo sapiens* y *Mus musculus* empleando la estrategia “target decoy” (Elias y Gygy et al., 2007). Para obtener la abundancia relativa de cada proteína se empleó una semicuantificación con el método del Factor de Abundancia Espectral Normalizado (NSAF, Normalized Spectral Abundance Factor). Los análisis de proteómica fueron analizados utilizando el Software “Crux mass spectrometry analysis toolkit” (Mcilwain et al., 2014). Se consideraron las proteínas en las cuales se detectaron al menos dos péptidos con un nivel de confianza de 0.99. El procedimiento se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Cinvestav-Irapuato.

2.12 Análisis de proteómica.

Se analizaron las proteínas identificadas con la aplicación ClueGO del programa Cytoscape (v.2.2.5) para clasificar y visualizar los procesos biológicos asociados a la CP. Los datos son analizados por evaluación hipergeométrica con ajuste del valor-p por Bonferroni. Los términos de la Ontología de Genes (GO) se visualizaron en nodos y su interacción en base al índice Kappa (0.5). Se comparó la diferencia en el perfil de proteínas de la CPH con respecto a la CPR. La información sobre la función de las proteínas se obtuvo del portal Uniprot ("UniProt", 2017).

2.13 Modelo de xenotransplante y tratamientos con las nanopartículas.

El protocolo para el estudio *in vivo* fue sometido a revisión por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del Cinvestav con el protocolo No. 0213-16. Se utilizaron ratones Crl:NU/NU-*nu*BR adultos de 6-8 semanas. La deficiencia en células T de estos ratones permite el crecimiento de células tumorales de otras especies. Los animales se mantuvieron a 12 h luz-oscuridad, a una temperatura constante de 26°C y una humedad relativa de 50-60% en cajas Super Mouse en condiciones libres de patógenos (4 animales por caja). Fueron alimentados con dieta comercial de laboratorio y agua *ad libitum*. Los animales se aclimataron una semana previa al tratamiento. La manipulación de los animales se realizó en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas y el consumo de agua, ingesta de alimento y peso se midieron diariamente.

Se trabajaron con tres grupos: 1) Grupo control, 2) grupo tratado con NP de SiO₂ y 3) grupo tratado con NP de SiO₂-PEG-Tf con 3 animales por cada grupo. En el día 0 se inocularon 4X10⁶ células A549 cultivadas en medio Ham's-F12 en 100 µl en el flanco izquierdo de cada animal para generar el modelo de xenotransplante. Durante dos semanas se registró el tamaño del tumor y fue calculado con la fórmula $(L \times A)^2/2 = \text{mm}^3$. Después de 15 días, los animales fueron administrados

con las NP a una dosis de 30 mg/kg en un volumen de 40 μ l de PBS vía intravenosa en la vena de la cola. 30 mg/kg es la dosis máxima tolerada vía intravenosa reportada en NP de SiO₂ mesoporosas (He et al., 2008). Un grupo control fue administrado con el vehículo PBS y sacrificado a las 24 horas. Después de la administración de las NP, los animales fueron sacrificados a las 4, 12 y 24 h. Se recolectaron el tumor, el hígado, el bazo, los pulmones, el riñón, el cerebro, la sangre y orina para cuantificar el Si por espectrometría de absorción atómica acoplada a horno de grafito.

2.14 Digestión de muestras biológicas.

Se utilizaron frascos de polipropileno de alta densidad para realizar las digestiones, las cuales se llevaron a cabo con la siguiente mezcla de ácidos:

ÁCIDOS	Cantidad en μl
<i>HCl</i>	75
<i>HNO₃</i>	125
<i>HF</i>	150

*Las muestras de órganos fueron cortadas con un cuchillo de cerámica y fueron incubadas durante toda la noche en la mezcla de ácidos.

Las digestiones se llevaron a cabo a 50°C en parrilla durante 1 h y 40 minutos. Durante la primera hora las muestras permanecieron en agitación constante. Posteriormente se añadieron 100 μ l de HNO₃ y después de 20 minutos tres gotas de H₂O₂ fueron adicionadas y las muestras agitadas por 20 minutos adicionales. Finalmente las muestras fueron recuperadas en agua MiliQ y guardadas a 4°C para su análisis.

Los cálculos para determinar la concentración de Si en órganos se realizaron de la siguiente manera:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} Si = \frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} (FD) (\text{Volumen de aforo})}{g \text{ órgano}}$$

Donde:

FD: Factor de dilución

Volumen de aforo para hígado, bazo y pulmón: 0.001L

Volumen de aforo para tumor: 0.0001L

g = gramos de peso del tejido

*Las muestras de sangre no fueron diluidas ni concentradas, por lo que la lectura del equipo, $\mu\text{g/L}$, representa la concentración de Si en la muestra.

2.15 Cuantificación por espectrometría de absorción atómica.

2.15.1 Principio.

La espectrometría de absorción atómica tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada que se basa en la ley de Beer-Lambert. La muestra es atomizada a través de una corriente eléctrica que se aplica sobre un tubo de grafito y posterior a la formación de átomos éstos absorberán la radiación emitida por una lámpara. Cada elemento va a responder a la excitación de una radiación de longitud de onda muy específica, ya que la radiación corresponde a la diferencia de energía entre dos niveles particulares del átomo (Skoog et al., 2001).

2.15.2 Procedimiento.

Para el análisis de contenido de silicio, las muestras (± 1 g) fueron digeridas en sistema abierto adaptado por aplicación de ácido fluorhídrico. La determinación de silicio en muestras se realizó por espectrometría de absorción atómica (Perkin-

Elmer, PinAAcle 900T) acoplada a horno de grafito, a una longitud de onda 251.6 nm y temperatura de atomización a 2350 °C Para aseguramiento de calidad y optimización del método se utilizó modificador de matriz $Mg(NO_3)$ al 0.3% muestras control de material de referencia certificado (CRM SOIL-B a una concentración de 150 $\mu g/L$). Solución de silicio 1,000 $\mu g/mL$ de alta pureza para estructurar la curva de calibración a 50, 100,150 y 200 ppb, los blancos de reactivo y las muestras duplicadas se corrieron con cada serie de digestión. En la estandarización del método, los valores experimentales de silicio (recuperación promedio) concuerdan con los valores certificados (95-105%). Las digestiones de las muestras y la cuantificación se realizó en el Laboratorio de Análisis y Monitoreo Ambiental en el Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo del IPN (CIIEMAD-IPN).

2.16 Análisis de resultados.

Se realizaron al menos tres experimentos independientes. En el estudio *in vivo* el número de animales fue de al menos 3 por grupo. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó como prueba de normalidad. Los datos se representan como media \pm desviación estándar (datos paramétricos) o mediana y rango (datos no paramétricos). Los datos con distribución no paramétrica fueron transformados para poder realizar una prueba de ANOVA de dos vías. Se utilizó el paquete estadístico SIGMASTAT 3.5. Los gráficos se hicieron con GraphPad Prism 5.

3 RESULTADOS

3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de SiO₂.

3.1.1 Tamaño primario y composición química de las nanopartículas de SiO₂.

La definición de NP comprende aquellas partículas manufacturadas que tienen un tamaño menor a 100 nm en sus tres dimensiones. Para estandarizar el proceso de síntesis y corroborar que se obtuvieron partículas con un tamaño primario menor a 100 nm se caracterizaron 3 síntesis independientes de las NP de SiO₂ por TEM-STEM. En la Figura 9 se muestran las imágenes representativas de las NP semiesféricas con una distribución de tamaño con rango de 12-48 nm, con un tamaño primario promedio de 26 ± 6.04 nm (Figura 10). Por la técnica de SEM-EDS se observó la morfología semiesférica de las NP (Figura 11) y se corroboró la composición elemental, donde el silicio y el oxígeno fueron los elementos mayormente representados, así como la ausencia de contaminantes (el carbono encontrado es componente de la cinta que se utiliza como soporte para montar las muestras) (Figura 12).

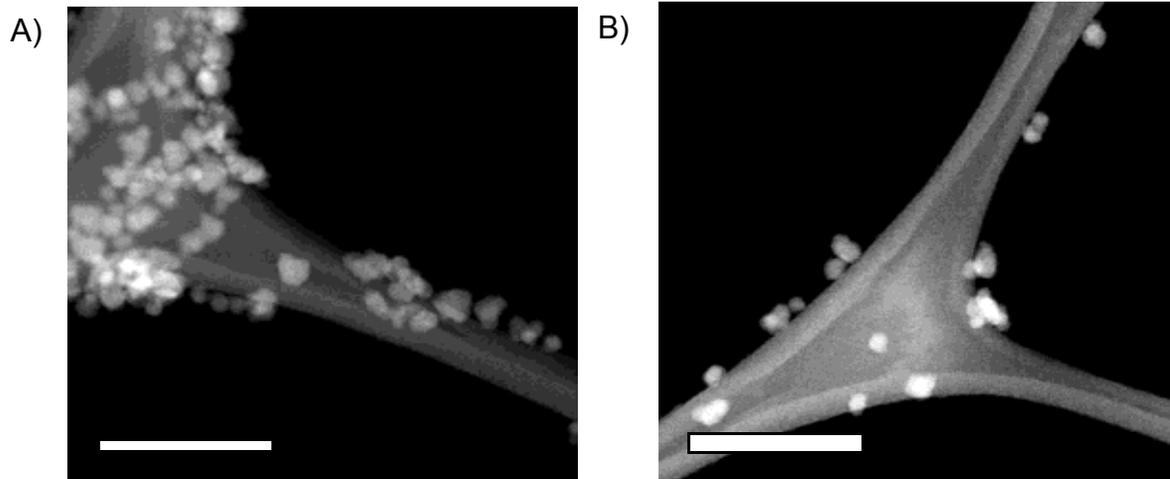


Figura 9. Tamaño primario de las NP de SiO₂. A y B) Imágenes de STEM. Escala: 200 nm.

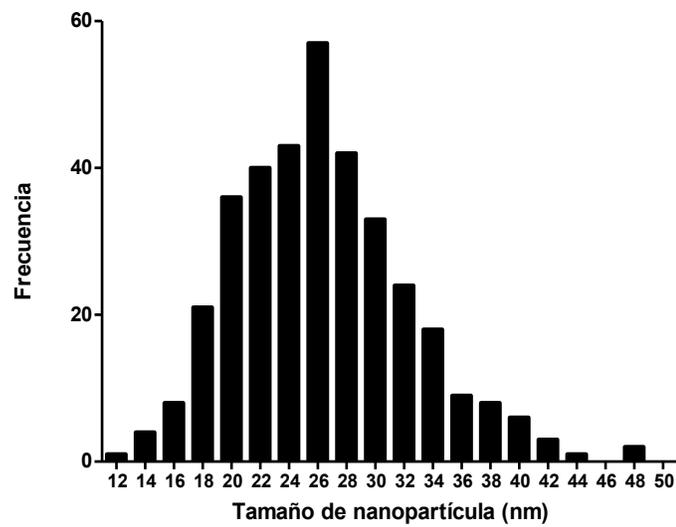


Figura 10. Distribución de tamaño de las NP de SiO₂. Se midió el tamaño de las NP en las imágenes de STEM por medio del software Digital Micrograph.

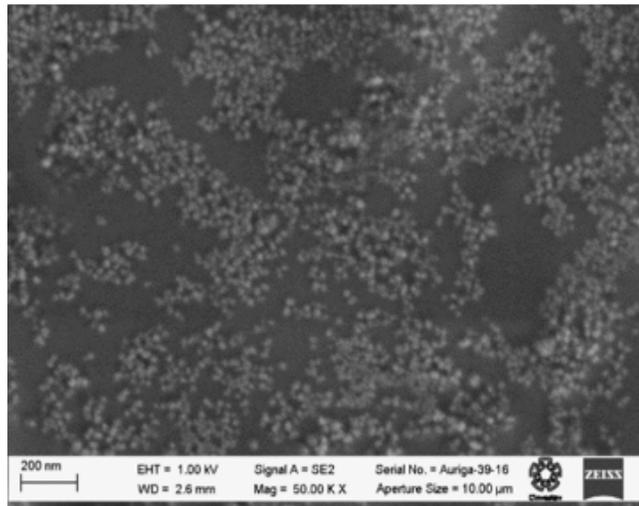
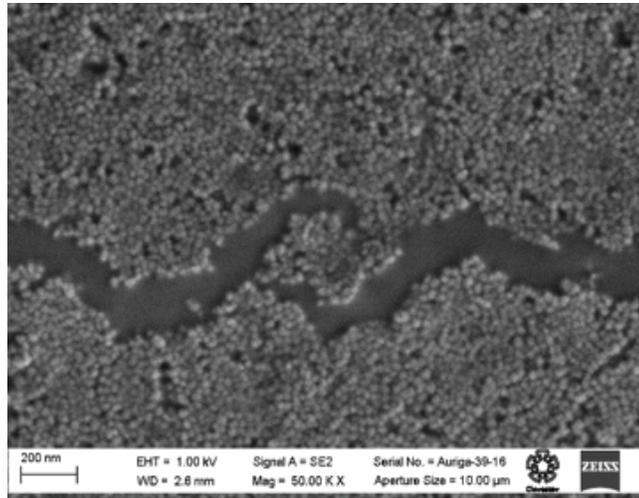
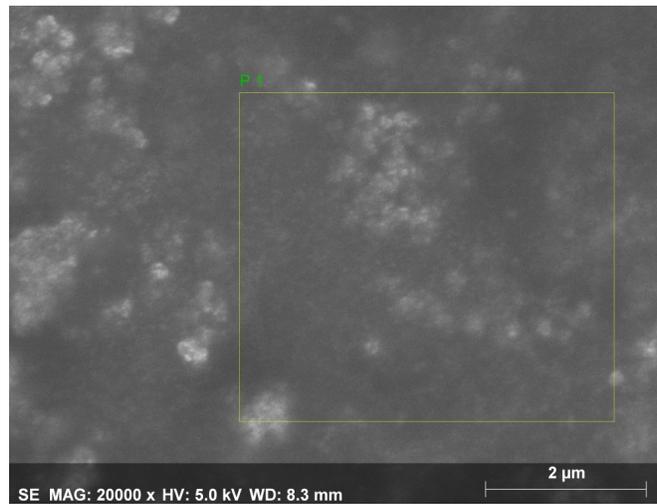


Figura 11. Imágenes de SEM de las NP de SiO₂.

A)



B)

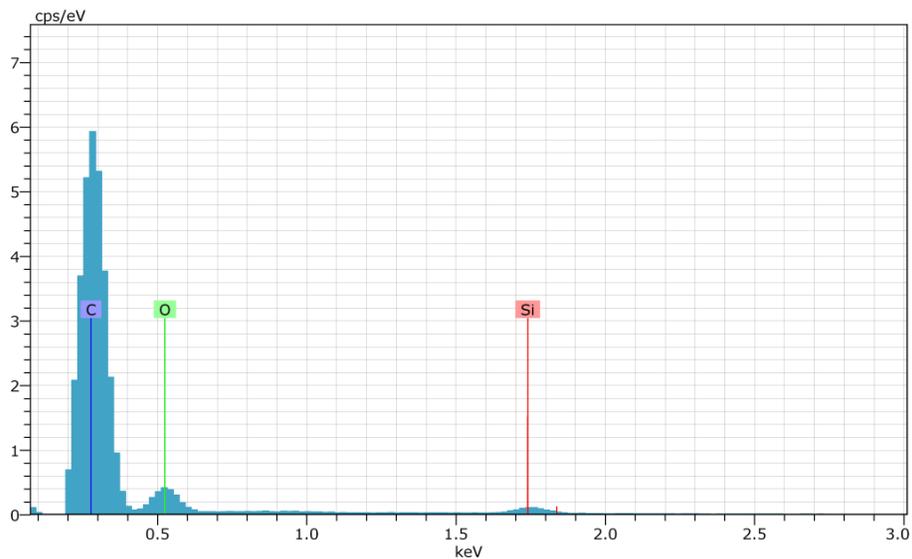


Figura 12. Composición elemental de las NP de SiO₂. A) Imagen del área en el que fue realizada la determinación. B) Composición elemental determinada por EDS, la línea azul representa la señal del carbono, la línea verde representa la señal del oxígeno, y la línea naranja representa la señal del silicio.

3.1.2 Diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las nanopartículas de SiO₂.

Las propiedades de las NP en medio seco pueden ser completamente diferentes a las propiedades que presentan las NP en medios acuosos. Por ejemplo, se ha observado que el tamaño primario de las NP difiere del tamaño de las NP en

dispersión (diámetro hidrodinámico - DH). Esto se debe al comportamiento coloidal de las NP en suspensión que son rodeadas por moléculas presentes en el medio donde están suspendidas. Principalmente, los iones rodean a las NP afectando sus cargas, la interacción entre ellas y por lo tanto su aglomeración y agregación. Esto finalmente determinará la estabilidad de la dispersión, y el tamaño en el medio acuoso como consecuencia de la agregación o aglomeración, al cual se estará enfrentando las células. Para determinar el DH de las NP y la reproducibilidad del protocolo de síntesis, se evaluaron por DLS y LDE 13 síntesis independientes. Se observó en la distribución de DH una población uniforme de NP (Figura 13) con un índice de polidispersión (PDI) menor a 0.5 y un rango de DH de ≈ 20 -50 nm (Tabla 2). El tamaño hidrodinámico promedio de las NP de SiO₂ fue de 28.92 ± 9.89 nm. Las NP que tuvieron un diámetro hidrodinámico promedio con más de dos o tres desviaciones estándar (48.7 y 58.6 nm, respectivamente) fueron descartadas para los siguientes procesos de aminación y funcionalización. Los valores de potencial zeta (ζ) obtenidos fueron de -21 a -31 mV en agua destilada con un promedio de -25.22 ± 4.63 mV (Tabla 3), lo que indica una repulsión entre las cargas de las NP lo que explica su monodispersión y por lo tanto su estabilidad en agua.

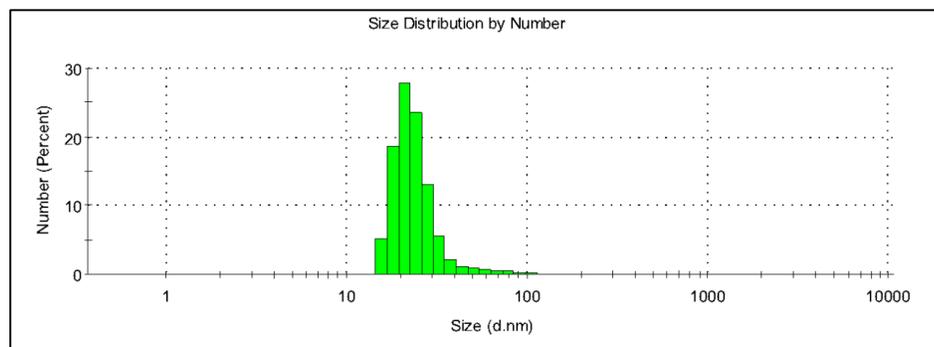


Figura 13. Gráfica representativa de la distribución de diámetro hidrodinámico de las NP de SiO₂.

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico y PDI de NP de SiO₂ en suspensión en agua.

Síntesis NP-SiO₂	DH nm	PDI
1	24	0.229
2	28	0.228
3	28	0.219
4	38	0.258
5	21	0.283
6	24	0.366
7	51	0.240
8	33	0.359
9	21	0.239
10	19	0.337
11	21	0.229
12	44	0.199
13	24	0.207

Los resultados representan 13 síntesis independientes (n=13).

Tabla 3. Potencial zeta de las dispersiones de las NP de SiO₂ en agua.

Síntesis NP de SiO₂	$\zeta \pm D.E$ mV
10	-22.5 ± 0.8
11	-25.6 ± 0.529
12	-31.6 ± 1.46
13	-21.1 ± 0.721

Los resultados representan 4 síntesis independientes. Las lecturas se realizaron por triplicado. Se representa la media ± desviación estándar.

3.2 Funcionalización de las nanopartículas de SiO₂.

3.2.1 Aminación de las nanopartículas de SiO₂.

Una de las ventajas de las NP de SiO₂ es la modificación versátil de su superficie para el anclaje de grupos funcionales que sirvan para la unión covalente de moléculas como fluorocromos, anticuerpos y proteínas. La aminación es una modificación muy útil para las NP ya que puede reaccionar con los grupos N-hidroxisuccinimida del PEG, grupos enlazadores para formar un enlace amida. Para lograr esta modificación las NP fueron aminadas con APTMS y ácido acético de acuerdo al protocolo anteriormente descrito y su modificación de superficie fue evaluada con un cambio en su P después del proceso de aminación. El PI para las NP de SiO₂ no aminadas se encuentra entre 3.4 y 4 mientras que para las NP de SiO₂ aminadas el PI es alrededor de 7.5. Lo anterior confirma el reemplazo de los grupos OH por los grupos amino debido a que la superficie de las NP con grupos OH tienen un PI de 2-3 con valores de potencial zeta negativos a pH neutros y básicos y de manera contraria, los grupos amino se protonan a pH ácido dando lugar a valores de potencial zeta positivos con PI cercanos a 7.5 (“nanoComposix”, 2018) (Figuras 14 y 15).

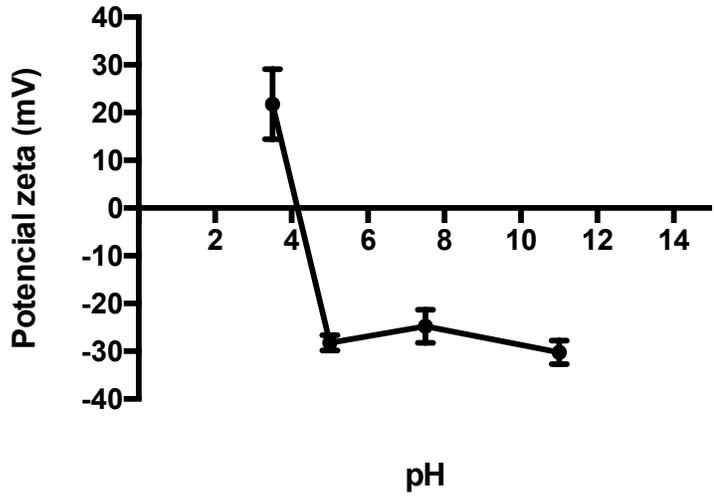


Figura 14. Gráfica del PI de las NP de SiO₂. Se midió el potencial zeta de las NP sin aminorar en agua con diferentes pH. Las lecturas se realizaron por triplicado. Tres experimentos independientes. Los datos representan la media ± desviación estándar.

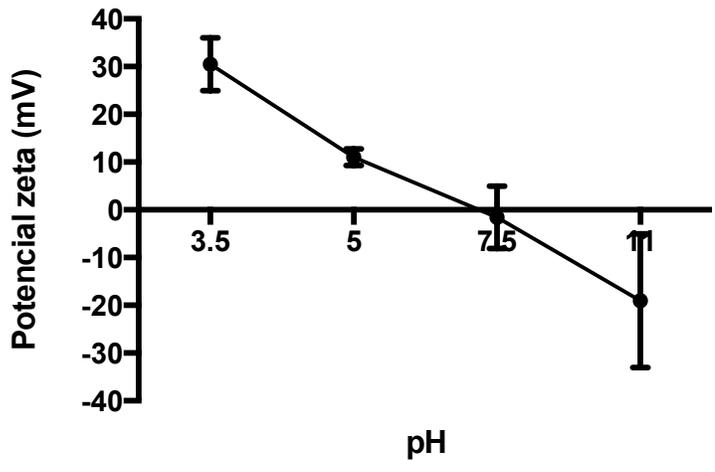


Figura 15. Gráfica del PI de las NP de SiO₂ aminadas. Se midió el potencial zeta de las NP aminadas en agua con diferente pH. Las lecturas se realizaron por triplicado. Tres experimentos independientes. Los datos representan la media ± desviación estándar.

3.2.2 Análisis de termogravimetría de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

Una vez que las NP fueron aminadas, éstas fueron funcionalizadas con PEG y transferrina. Se utilizó un PEG que actúa como enlazador para unir la transferrina a la NP. Este PEG contiene un grupo éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y un grupo maleimido. El grupo éster N-hidroxisuccinimida reacciona con aminas primarias a pH de 7 a 9 (en este caso los grupos amino de la NP) formando enlaces amidas, mientras que el grupo maleimido, en pH de 6.5 a 7.5, reacciona con un grupo sulfhidrilo añadido a la proteína a través de un grupo N-succinimidil-S-acetil(tiotetraetilenglicol) (SATPEG₄). Una vez realizado este procedimiento, siguiendo los pasos descritos en métodos, se realizó un análisis de TGA para determinar la presencia de compuestos orgánicos (en este caso PEG y Tf). La pérdida de masa en función de la temperatura fue registrada para las muestras NP sin funcionalizar y NP funcionalizadas con PEG y Tf. Dos pérdidas de masa fueron evidentes en las NP funcionalizadas con PEG y Tf de 26.31% y 9.318% a 289.22°C y 414.71°C, respectivamente (Figura 16). En contraste, con las NP de SiO₂ no se observó una pérdida de masa importante conforme al aumento de la temperatura (Figura 17). En el rango de temperatura de 200°C a 400°C observamos la degradación de la proteína transferrina (Figura 18) y también a éstas temperaturas se ha reportado la descomposición de PEG (Mansfield et al., 2014). Con lo anterior podemos inferir que están presentes estos compuestos orgánicos en la suspensión de las NP funcionalizadas.

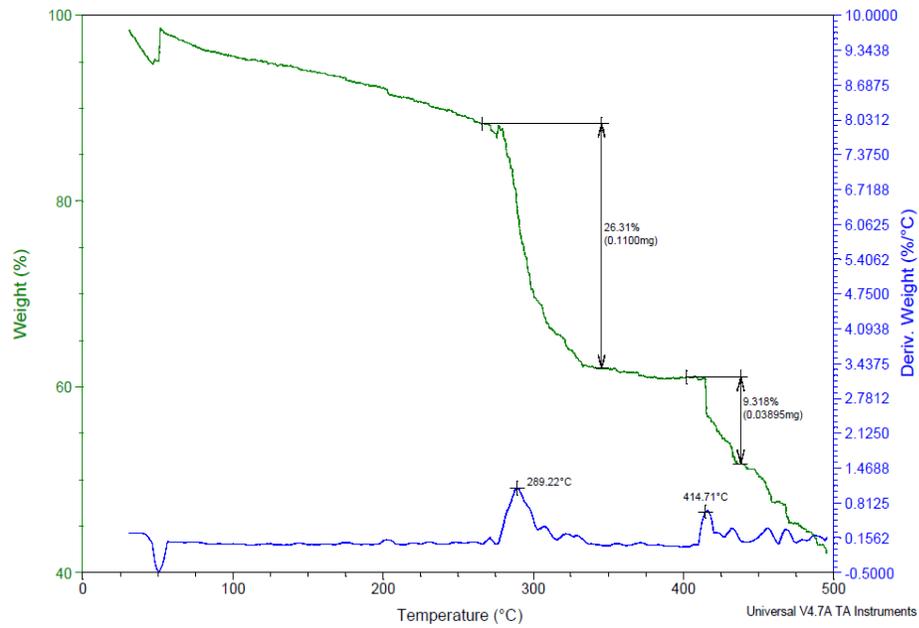


Figura 16. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

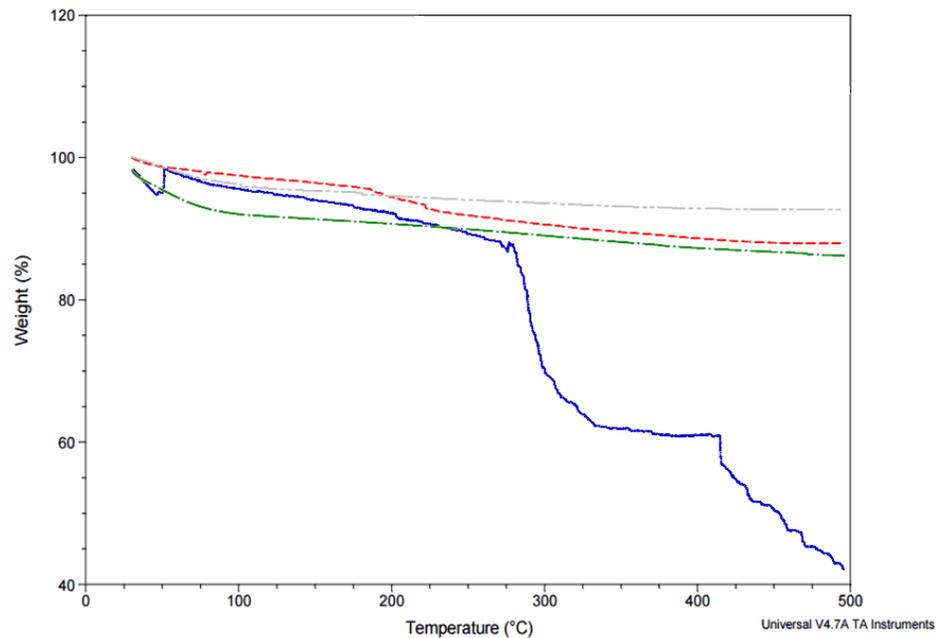


Figura 17. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de las NP funcionalizadas. Comparación de la pérdida de masa de las NP sin funcionalizar y funcionalizadas con PEG y Tf. Las líneas gris, roja y amarilla representan las NP de SiO₂ sin funcionalizar y la línea azul representa las NP de SiO₂ funcionalizadas

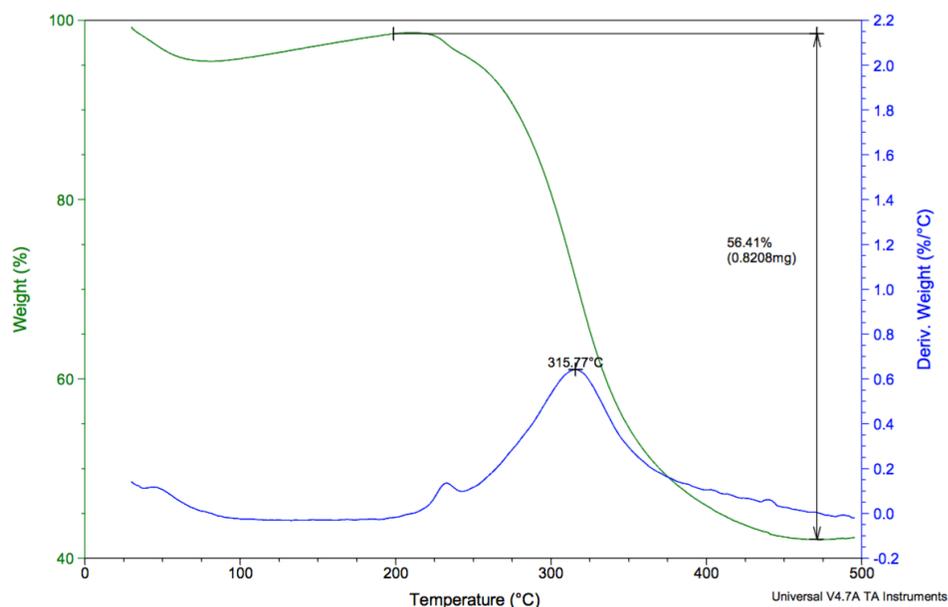


Figura 18. Curva termogravimétrica (TGA) y derivada DTG de la transferrina.

3.2.3 Cuantificación de transferrina en las NP de SiO₂ funcionalizadas.

Una vez determinada la presencia de compuestos orgánicos en la suspensión de NP funcionalizadas se cuantificó por el ensayo colorimétrico de BCA la cantidad de proteína (Tf) presente en la suspensión de NP. La cantidad de proteína fue calculada a partir del gráfico de calibración que se realizó con los estándares de BSA para los protocolos de síntesis descritos por Salvati et al., 2013 y Zarschler et al., 2014. Debido a que en los ensayos colorimétricos las NP u otros compuestos pueden producir interferencias subestimando o sobreestimando los resultados, se determinó si existe un desarrollo del color independiente de la presencia de Tf. Por lo cual se evaluaron los intermediarios y producto final de las síntesis en este ensayo: NP de SiO₂, NP de SiO₂ aminadas, NP SiO₂-PEG y NP de SiO₂-PEG-Tf, así como las NP de SiO₂ incubadas con TCEP y posteriormente lavadas (tres veces con PBS). De todas las muestras, únicamente las NP de SiO₂-PEG presentaron un ligero color púrpura con una absorbancia de 0.32 (Tabla 4). La

absorbancia de las NP completamente funcionalizadas (SiO₂-PEG-Tf) presentó una coloración intensa con valores de absorbancia de 0.8. A dicho valor se le restó el valor de fondo determinado en las NP de SiO₂-FITC- PEG para determinar la concentración final de Tf. En la Tabla 5 se presenta la concentración de proteína de tres síntesis independientes de las NP de SiO₂ funcionalizadas con un valor de 57.48 ± 6.83 µg/mg de NP.

Tabla 4. Cuantificación de proteína en la suspensión de las NP de SiO₂ y NP de SiO₂ funcionalizadas.

NP	Absorbancia	µG PROT/MG NP
NP	0.1566	
NP NH	0.1449	
NP Peg	0.32785	
NP TCEP	0.19	
NPFa (Salvati et al., 2013)	0.143	4.2
NPFb (Salvati et al., 2013; Zarschler et al., 2014)	0.323	35

NP: NP sin funcionalizar.

NP NH: NP aminadas.

NP PEG: NP pegiladas.

NP TCEP: NP pegiladas con TCEP y lavadas posteriormente 3 veces.

NPFa: NP funcionalizadas con el protocolo descrito por Salvati et al., 2013.

NPFb: NP funcionalizadas con los protocolos descritos por Salvati et al., 2013 y Zarschler et al., 2014.

Tabla 5. Concentración de proteína en la suspensión de NP de SiO₂ funcionalizadas.

NP	µg/mg NP
NPF1	63.33
NPF2	59.15
NPF3	49.97

Los datos representan la cuantificación de tres síntesis independientes de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

3.2.4 Diámetro hidrodinámico de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

El diámetro hidrodinámico de las NP puede aumentar cuando éstas son modificadas en su superficie y se encuentran dispersadas en medios con alta osmolaridad tales como el PBS. El diámetro hidrodinámico de las NP de SiO₂-PEG-Tf en PBS fue de 207 nm, con un PDI de 0.253 y un potencial zeta de -19.5 mV. Después de la formación de la CP, el diámetro fue de 183 nm, con un PDI de 0.336 y un potencial zeta de -18 mV (Tabla 6).

Tabla 6. Diámetro hidrodinámico de las NP de SiO₂-PEG-Tf.

PBS ^a			CP ^b		
DH nm	PDI	ζ(mV)	DH nm	PDI	ζ(mV)
207.3 ± 2.9	0.253 ± 0.018	-19.5 ± 0.5	183.8 ± 8.22	0.366 ± 0.04	-18.2 ± 1.69

^a DH y ζ obtenidos por dispersión dinámica de luz y electroforesis laser tipo Doppler.

^b CP en las NP de SiO₂ funcionalizadas.

Los valores representan la media ± desviación estándar.

3.2.5 Contenido de endotoxina de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

La contaminación por endotoxina durante la síntesis de NP es muy frecuente y pocas veces reportada. La presencia de ésta en la suspensión de NP puede tener interferencia en las evaluaciones biológicas subestimando o sobrestimando los parámetros o la respuesta celular, especialmente en estudios de inmunotoxicidad. Para verificar que las NP estén libres de endotoxina se realizó el ensayo de Amebocitos de Limulus Cromogénico de punto final con estándares de endotoxina. Las NP de SiO₂ funcionalizadas mostraron tener una concentración de 0.01 EU/ml (con un coeficiente de variación del 10.50%) valor por debajo del límite permitido por la FDA para dispositivos médicos <0.06 EU/ml.

3.3 Formación de la corona de proteínas.

Cuando las NP entran en contacto con los medios biológicos son recubiertas principalmente por proteínas formando la CP. Para aquellas NP que se pretenden administrar vía intravenosa el plasma es el principal compartimento y por lo tanto las proteínas presentes en esta matriz participarán en la formación de la corona. Para evitar la adsorción de estas proteínas se han desarrollado polímeros como el PEG para evitar la opsonización y fagocitosis de las NP por el sistema retículo-endotelial. Para determinar el grado de interacción de las NP funcionalizadas con las proteínas del plasma, las NP fueron incubadas al 55% de plasma y posteriormente lavadas para obtener la corona de proteínas dura. Finalmente, las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel. Por densitometría se observó que las NP de SiO₂-PEG-Tf adsorbieron una menor cantidad de proteínas (carril No. 4, Figura 19) en comparación con las NP de SiO₂ (carril 2, Figura 19). Lo anterior concuerda con lo reportado, en donde la presencia de PEG disminuye la adsorción de proteínas, aunque no la evita completamente (Escamilla-Rivera et al., 2016).

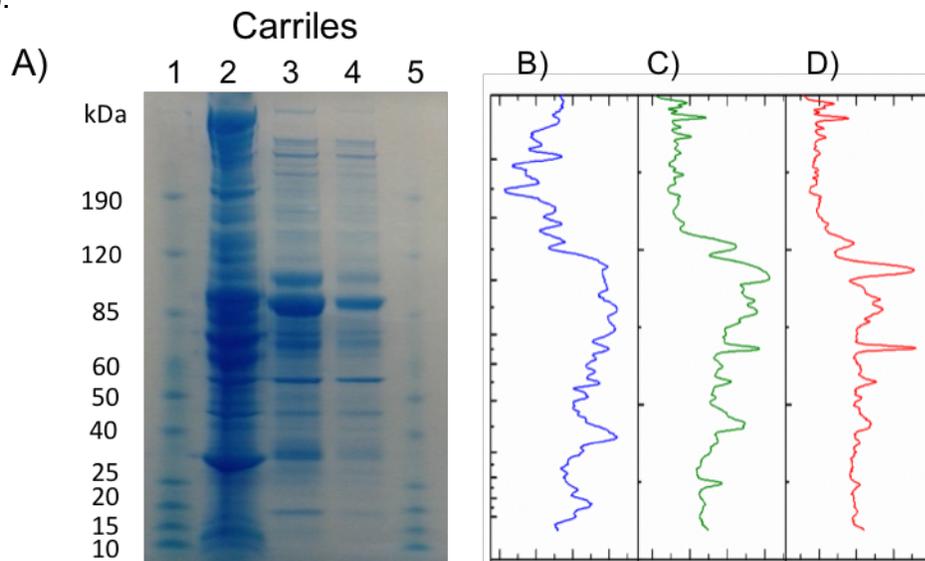


Figura 19. Análisis de la CP de las NP por electroforesis en gel. Carriles 1) Marcador de peso molecular, 2) NP de SiO₂, 3) SiO₂-PEG, 4) SiO₂-PEG-Tf y 5) Marcador de peso molecular. Las NP fueron incubadas a una concentración de 1.5 mg/ml en 55% de plasma humano durante 30 min a 37^aC. Después de tres lavados, las proteínas unidas fueron separadas por A) Electroforesis en gel de 4-12% SDS-poliacrilamida. Análisis de densitometría por Image J del B) carril 2, C) carril 3 y D) carril 4. El análisis se realizó con una síntesis independiente.

3.3.1 Corona de proteínas de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

Las NP funcionalizadas fueron incubadas con plasma humano y plasma de ratón, a la misma concentración 55%, con la finalidad de comparar la composición de la corona de proteínas en ambas matrices. Por electroforesis en gel se observaron diferencias en la identidad de las proteínas adsorbidas en las NP de SiO₂ funcionalizadas, entre la CP formada en plasma humano y de ratón, que se encuentran principalmente entre los 190 a 120 kDa y de los 60 a los 20 kDa (Figura 20).

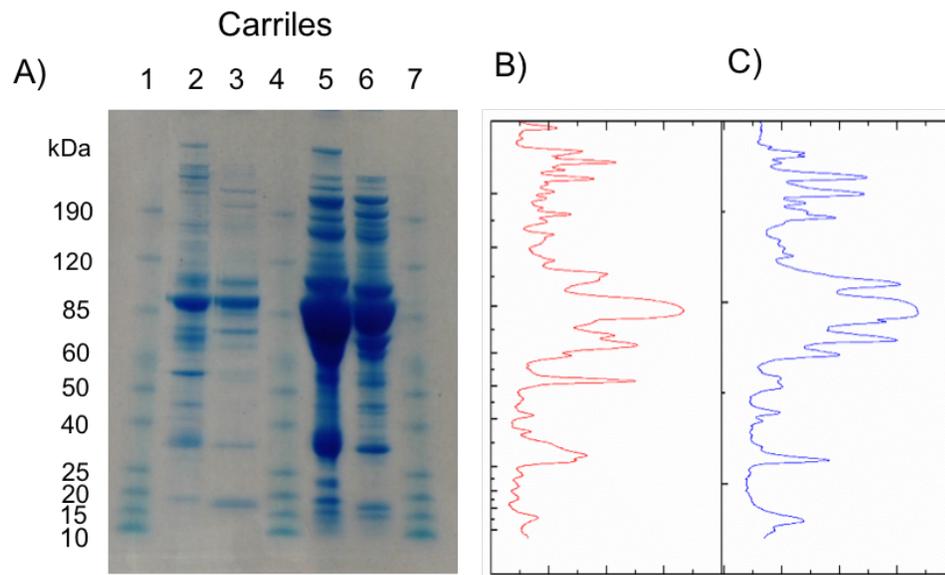


Figura 20. Análisis de la CP formada en plasma humano y de ratón en las NP funcionalizadas por electroforesis en gel. Carriles 1) Marcador de peso molecular, 2) CPH, 3) CPR, 4) marcador de peso molecular, 5) plasma humano, 6) plasma de ratón, 7) marcador de peso molecular. Las NP fueron incubadas con plasma de humano (CPH) o de ratón (CPR) durante 30 min a 37°C. Después de tres lavados, las proteínas adsorbidas fueron separadas por A) Electroforesis en gel de 4-12% poliacrilamida. Análisis de densitometría por Image J del B) carril de la CPH y C) carril de la CPR. El análisis se realizó con dos síntesis independientes. PH: Plasma humano, PR: Plasma de ratón como controles.

3.3.2 Perfil de la corona de proteínas de las NP de SiO₂ funcionalizadas.

De las proteínas adsorbidas en la CP formada en plasma humano se detectaron 1020 proteínas, mientras que en plasma de ratón se identificaron 576. Entre ambas matrices se comparten 316 proteínas, siendo únicas 704 y 260 para proteínas adsorbidas del plasma de humano y de ratón, respectivamente (Figura 21). De acuerdo a la clasificación de Anderson y Anderson en el 2002, las proteínas del plasma se clasifican en proteínas clásicas, proteínas liberadas de tejido e interleucinas. Para determinar las proteínas comunes específicas que conforman la CP, éstas fueron localizadas en la lista de 289 proteínas reportadas en la literatura y se presentan en la Tabla 7.

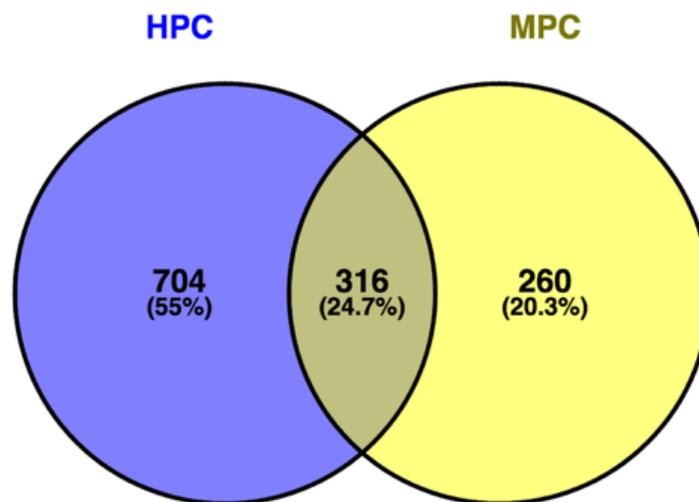


Figura 21. Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas identificadas en la CP en plasma humano (CPH) y de ratón (CPR).

3.3.3 Procesos biológicos asociados al perfil de la corona de proteínas.

Los procesos biológicos con los cuales están asociadas las proteínas adsorbidas en la superficie de las NP son muy diversos. El perfil de la CP formada en plasma humano (CPH) se asocia con procesos tales como la activación del sistema

inmune, vía de señalización mediada por receptor Fc, activación del complemento, citotoxicidad mediada por células *natural killer*, vía de señalización mediada por integrinas, transporte, coagulación, señalización mediada por GTPasa, transporte vesicular Post-Golgi, establecimiento de la barrera endotelial y regulación negativa de la muerte celular programada (Figura 22). Por otro lado, la CP formada en plasma de ratón (CPR) comparte alguno de estos procesos biológicos pero, se observan otros de manera única como la respuesta a sustancias orgánicas, el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y el desarrollo del sistema inmune (Figura 23 y Tabla 8).

3.3.4 Perfil de la corona de proteínas formada en plasma de humano y de ratón.

Las proteínas asociadas a la CP formada en plasma de humano están relacionadas a la señalización mediada por receptor Fc, regulación de los filamentos de actina, procesos metabólicos, activación del complemento, desarrollo de la sustancia negra y transporte de lípidos. Mientras que en el perfil de la CP formada en plasma de ratón se encuentran procesos implicados en la coagulación, regulación de la migración celular, remoción de lipoproteínas del plasma y oxidación de lipoproteínas. Sin embargo, se realizó un comparativo de las 25 proteínas más abundantes en cada corona, a través de la abundancia relativa de cada proteína. Los resultados mostraron que la albúmina es la proteína más abundante en ambas matrices (cerca del 10%), pero la CPH absorbe en mayor abundancia inmunoglobulinas (7%), actina citoplasmática 1 (3.46%), hemoglobina subunidad beta (1.56%), serotransferrina (1.44%), ficolina-3 (1.38%), complemento C3 (1.30%) y apolipoproteína A-1 (1.29%). Mientras que la CPR mostró mayor abundancia de inhibidor de serina proteasa A3K (5.88%), serotransferrina (5.29%), alfa-1-antitripsina 1-2 (3.55%), hemoglobina subunidad beta (3), fibrinógeno cadena gama (2.56%) y fibrinógeno cadena beta (2.56%) (Figura 24).

Tabla 7. Lista de proteínas comunes en el perfil de la CP en plasma humano y de ratón.

Nombre de la proteína	Función
Alfa-1-glicoproteína ácida	Transporta proteínas y fármacos en circulación sanguínea. Modula la actividad del sistema inmune durante la fase de reacción aguda.
Alfa-2-antiplasmina	Inhibe a la plasmina y la tripsina regulando la cascada de coagulación sanguínea.
Alfa-2-HS-glicoproteína	Promueve la endocitosis como opsonina. Tiene afinidad por los iones calcio y bario.
Angiotensinógeno	Componente del sistema renina-angiotensina (RAS), regula la presión sanguínea y la homeostasis de electrolitos.
Antitrombina-III	Inhibidor de proteasa serina que regula la cascada de coagulación sanguínea.
Apolipoproteína A-I, A-II, A-IV, B-100, C-I, C-III, C-IV, D, E	Transporte y metabolismo de lípidos.
Beta-2-microglobulina	Componente del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC) que está involucrado en la presentación de antígenos.
Carboxipeptidasa	Enzima que hidroliza el aminoácido terminal de un polipéptido en su grupo carboxilo libre.
CD5L	Regula la síntesis de lípidos. Se expresa por macrófagos que regulan los mecanismos de inflamación.
Ceruloplasmina	Tiene actividad de ferroxidasa involucrada en el transporte de hierro a través de la membrana celular.
Factor de coagulación V, VII, X, XI, XII, XIII A cadena, XIII B cadena	Regula la coagulación sanguínea.
Complemento C1q, C2, C3, C4-B, C5, C8, C9	Activación del complemento.
Factor de complemento B, H, I	Activación del complemento.
Fibrinógeno cadena alfa, beta y gama	Es escindido por la trombina para dar lugar a monómeros que polimerizan y forman una matriz insoluble (fibrina).
Fibulina-1	Adhesión celular y migración a lo largo de las fibras proteicas dentro de la matriz extracelular.
Gelsolina	Promueve el ensamblaje de monómeros en filamentos.
Glutatión peroxidasa 3	Protege a la célula y enzimas del daño oxidante.
Haptoglobina	Captura y se combina con la hemoglobina libre en plasma para el reciclaje hepático.
Hemoglobina	Transporta oxígeno desde los pulmones a los tejidos periféricos.
Hemopexina	Se une y transporta al grupo hemo hacia el hígado para su rompimiento y recuperación del hierro
Glicoproteína rica en histidina	Es una proteína adaptadora que regula los complejos inmunes y la eliminación de patógenos, quimiotaxis celular, adhesión celular, angiogénesis y coagulación.
Inmunoglobulinas	Eliminación de los antígenos en la fase de la inmunidad humoral.
Inhibidor inter alfa de tripsina, H1 H2	Actúa como acarreador de hialuronano en suero o como proteína de unión entre el hialuronano y otra matriz proteica.
Isocitrato deshidrogenasa	Enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato produciendo alfa-cetoglutarato.
Cininógeno-1	Actúa como un inhibidor de tiol-proteasas.
L-lactato deshidrogenasa cadena A	Enzimas que catalizan lactato produciendo piruvato.
Proteasa de serina de lectina unión a manosa	Reconoce patógenos a través del patrón de azúcares en la vía del complemento a través de lectinas.
Inhibidor de metaloproteinasas 3	Inactiva metaloproteinasas al unirse al sitio del cofactor zinc.
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	Digiere al péptido activo peptidoglicano en fragmentos biológicamente inactivos.
Calicreína plasmática	Enzima que escinde en las uniones Lys-Arg y Arg-Ser. Tiene un papel en el sistema renina-angiotensina.
Plasminógeno	Disuelve la fibrina y actúa como factor proteolítico en el desarrollo embrionario, remodelamiento tisular e inflamación.
Factor plaquetario 4	Se libera durante la agregación plaquetaria. Quimiotáctico de neutrófilos y monocitos. Inhibe la proliferación de células endoteliales.
Proteína de unión a retinol 4	Transporta retinol desde el hígado a los tejidos periféricos.
Albúmina	La principal proteína del plasma que une calcio, sodio, potasio, ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y fármacos.
Vitronectina	Es un factor de adhesión y expansión celular.
Factor Von Willebrand	Promueve la adhesión de plaquetas al sitio del daño vascular.
Zinc-alfa-2-glicoproteína	Estimula la degradación de lípidos en adipocitos.

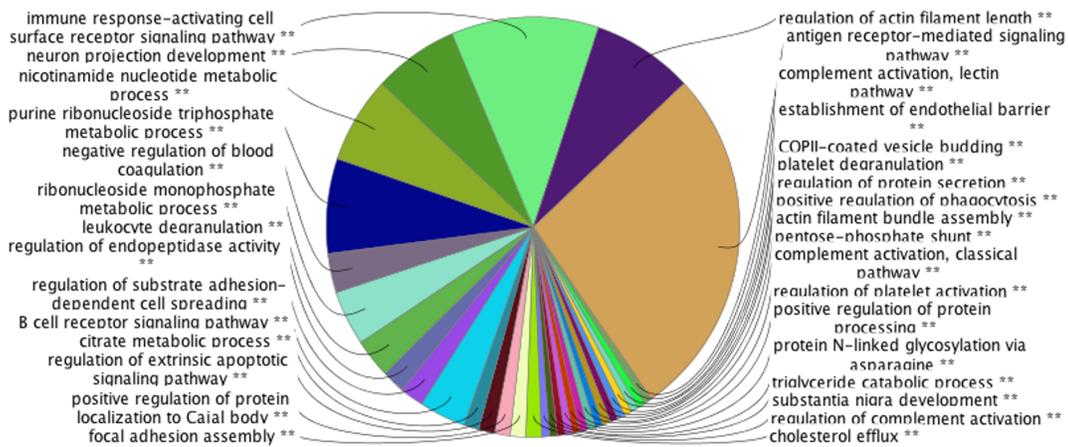


Figura 22. Red de procesos biológicos implicados en el perfil de la CP en plasma humano. La identificación de los procesos se realizó con el programa ClueGO de Cytoscape

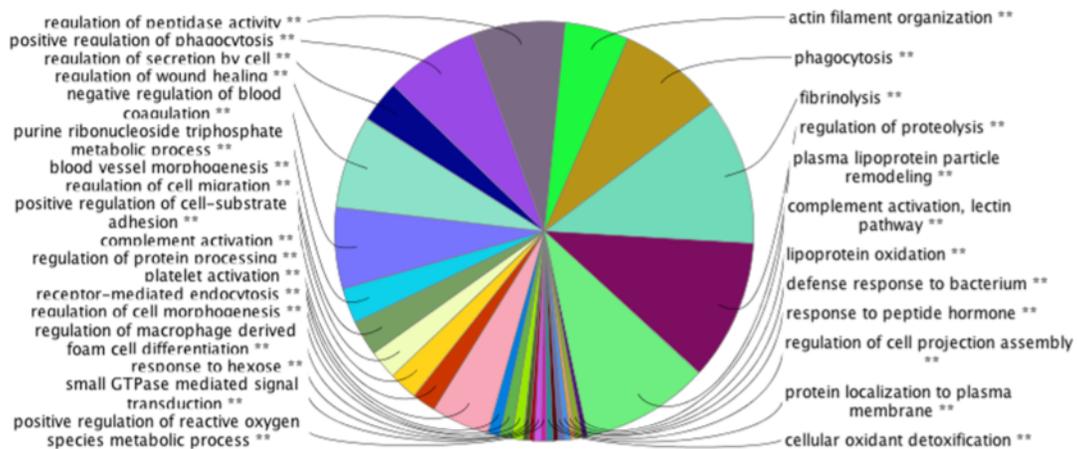


Figura 23. Red de procesos biológicos implicados en el perfil de la CP en plasma de ratón. La identificación de los procesos se realizó con el programa ClueGO de Cytoscape

Tabla 8. Comparación de los procesos biológicos asociadas al perfil de la CP en plasma humano y de ratón.

Procesos biológicos-GO	Perfil de la CP	
	Plasma humano	Plasma de ratón
<i>Activación de la respuesta inmune</i>	✓	✓
<i>Vía de señalización a través del receptor Fc</i>	✓	
<i>Activación del complemento</i>	✓	✓
<i>Citotoxicidad mediada por Natural killer</i>	✓	
<i>Vía de señalización mediada por integrinas</i>	✓	✓
<i>Regulación del citoesqueleto de actina</i>	✓	✓
<i>Transporte</i>	✓	✓
<i>Remoción de lipoproteínas del plasma</i>		✓
<i>Proceso metabólico de las purinas ribonucleótido trifosfato</i>	✓	✓
<i>Respuesta a sustancias orgánicas</i>		✓
<i>Respuesta a metabolismo de las especies reactivas de oxígeno</i>		✓
<i>Regulación de la coagulación sanguínea</i>	✓	✓
<i>Regulación de la actividad peptidasa</i>	✓	
<i>Vía de señalización GTPasas</i>	✓	✓
<i>Transporte vesicular Post-Golgi</i>	✓	
<i>Establecimiento de la barrera endotelial</i>	✓	
<i>Morfogénesis</i>		✓
<i>Regulación negativa de la muerte celular por apoptosis</i>	✓	

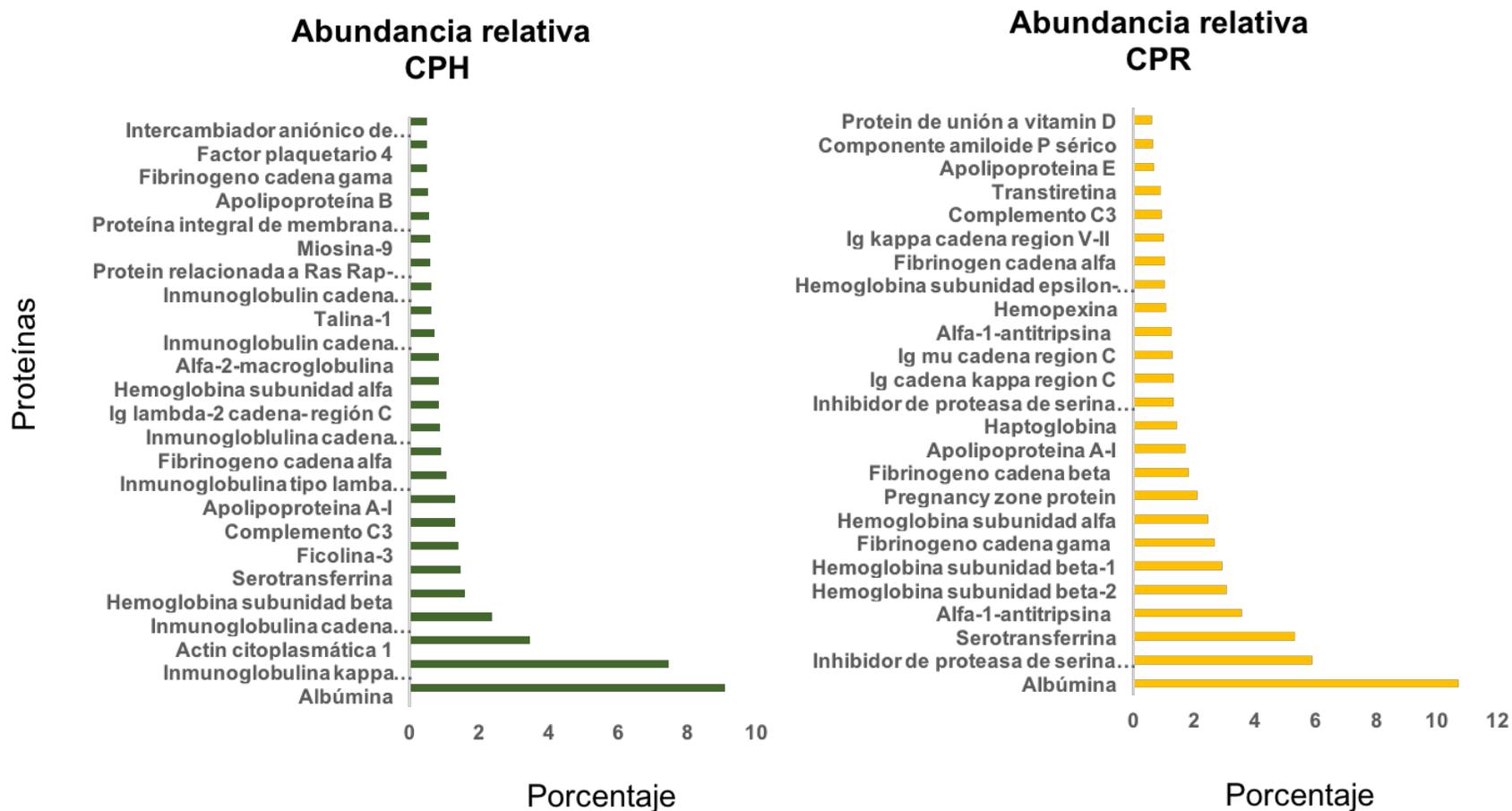


Figura 24. Abundancia relativa de las proteínas encontradas en los perfiles de la A)CPH y B)CPR de las NP de SiO₂ funcionalizadas. Semicuantificación por el método NSAF.

3.4 Cuantificación por espectrometría de absorción atómica.

Con el objetivo de evaluar la biodistribución de las NP de SiO₂ y NP de SiO₂ funcionalizadas y su capacidad para llegar al área tumoral en presencia de la CP, se estableció un modelo de xenotransplante en ratones NU/NU. En la Figura 25 se muestra el crecimiento del tumor en el modelo de xenotransplante durante 15 días. Posteriormente, éstos fueron administrados con las NP de SiO₂ o NP de SiO₂ funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 h. Un grupo control administrado con PBS fue sacrificado a las 24 h. Posteriormente la cantidad de Si en sangre, pulmón, hígado, bazo y tumor se cuantificó por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. En la Tabla 9 se presentan la concentración de Si en sangre y órganos con las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En la Figura 26 se muestran los resultados de la cinética de ambas NP en sangre. Se observó que la concentración de Si en sangre a las 4 h de ratones administrados con NP de SiO₂ alcanzó niveles de 300 µg/L, menores en comparación con los niveles de Si en sangre de animales administrados con NP funcionalizadas (534.23 ± 152.97 µg/L). Esta última concentración tuvo una tendencia a disminuir a las 12 y 24 h. No hay diferencias estadísticamente significativas.

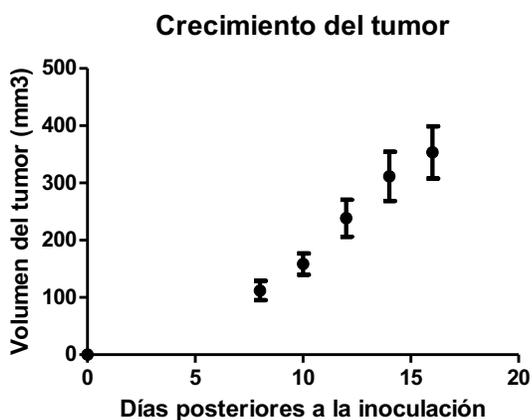


Figura 25. Crecimiento del tumor en un modelo de xenotransplante en ratones NU/NU con células A549. Se muestra el volumen del tumor en mm³ después de la administración de células A549 en el flanco derecho de ratones NU/NU. Los datos representan la media ± error estándar. n=28 animales.

Tabla 9. Concentración de Si en sangre y órganos.

	Grupo control	Horas	NP de SiO ₂	NP de SiO ₂ funcionalizadas
Sangre µg/L	205.6 ± 220	4	310.67 ± 142.87	534.23 ± 152.97
		12	114.9 ± 36.95	372.44 ± 279
		24	323.56 ± 223.12	220 ± 141
Pulmón µg/g	0.449 (0.271-0.523)	4	17.5 (0.536-23.88)**	10.60 (1.832-18.17)**
		12	2.569 (0.482-12.21)	2.79 (0.440-6.24)
		24	0.626 (0.095-0.801)	0.554 (0.274-1.030)
Hígado µg/g	0.557 (0.439-2.327)	4	0.355 (0.039-0.617)	0.226 (0.205-0.435)
		12	0.420 (0.233-0.437)	0.314 (0.157-0.481)
		24	1.048 (0.727-6.177) ^a	0.223 (0.195-0.531) ^a
Bazo µg/g	0.252 (0.025-0.500)	4	0.480 (0.450-0.500)	0.470 (0.460-0.500)
		12	0.057 (0.053-0.190)	0.106 (0.069-0.194)
		24	0.062 (0.062-0.370) ^{aa}	0.615 (0.377-0.139) ^{*aa}
Tumor µg/g	0.39 ± 0.22	4	0.31 ± 0.16 ^a	0.83 ± 0.12 ^a
		12	0.59 ± 0.20	0.79 ± 0.32
		24	0.63 ± 0.09	0.87 ± 0.26 [*]

Los valores representan la media ± desviación estándar datos de sangre y tumor. Se representa la mediana ± rango para datos de pulmón, hígado y bazo. n=3-4 animales. El grupo control administrado con PBS se sacrificó a las 24 horas. Se realizó un ANOVA de dos vías con datos transformados (logaritmo para datos de hígado y bazo, raíz cuadrada para datos de pulmón). La diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos se representa como: *comparación contra el control y ^acomparación entre NP. *p<0.05, **p<0.01, ^ap<0.05, ^{aa}p<0.01 estadísticamente significativo.

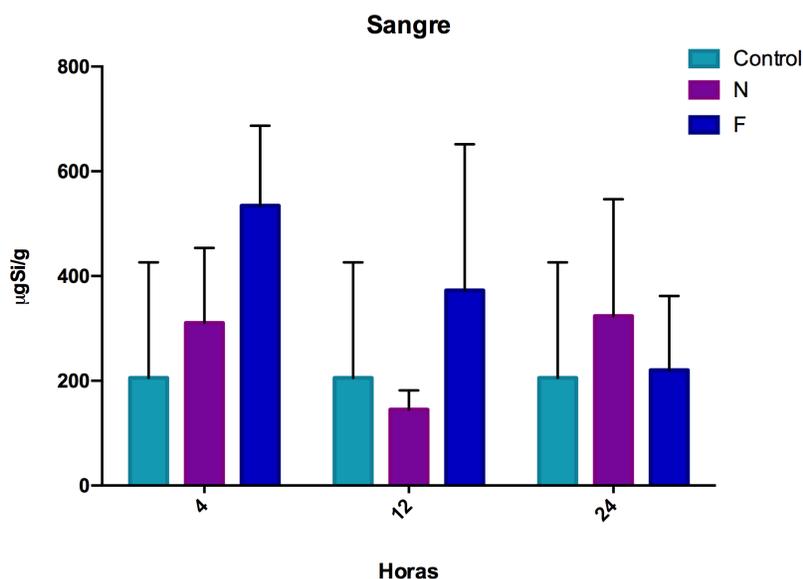


Figura 26. Concentración de Si en sangre ($\mu\text{g/L}$). Los animales fueron administrados a una dosis única de 30 mg/kg de N) NP de SiO_2 o F) NP de SiO_2 funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 hrs. Los animales control fueron administrados con PBS y sacrificados a las 24 h. $n = 3-4$ animales por grupo. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Anova de dos vías. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. $p < 0.05$.

En la cuantificación de Si en órganos, en ambos tratamientos, el pulmón presentó la mayor concentración de Si a las 4 h, 17.5 (0.536-23.88) $\mu\text{g/g}$ y 10.60 (1.832-18.17) $\mu\text{g/g}$ para NP de SiO_2 y NP de SiO_2 funcionalizadas, respectivamente, concentración que fue diferente respecto al control estadísticamente significativo. En hígado, la concentración de Si fue muy baja, únicamente se observó una diferencia estadísticamente significativa a las 24 horas en donde el tratamiento con NP de SiO_2 presentó mayor concentración de Si, 1.048 (0.727-6.177) $\mu\text{g/g}$, en comparación con el tratamiento con NP de SiO_2 funcionalizadas de 0.223 (0.195-0.531) $\mu\text{g/g}$ (Figura 27). En bazo, la concentración de Si a las 24 h entre ambos tratamientos fue diferente, 0.062 (0.062-0.370) $\mu\text{g/g}$ y 0.615 (0.377-0.139) $\mu\text{g/g}$, siendo mayor para el tratamiento NP de SiO_2 funcionalizadas. En tumor a las 4 h hay una diferencia significativa entre ambos tratamientos, y a las 24 h la cantidad de Si en el tratamiento con NP de SiO_2 funcionalizadas es mayor con respecto al control ($0.87 \pm 0.26^* \mu\text{g/g}$) (Figura 28).

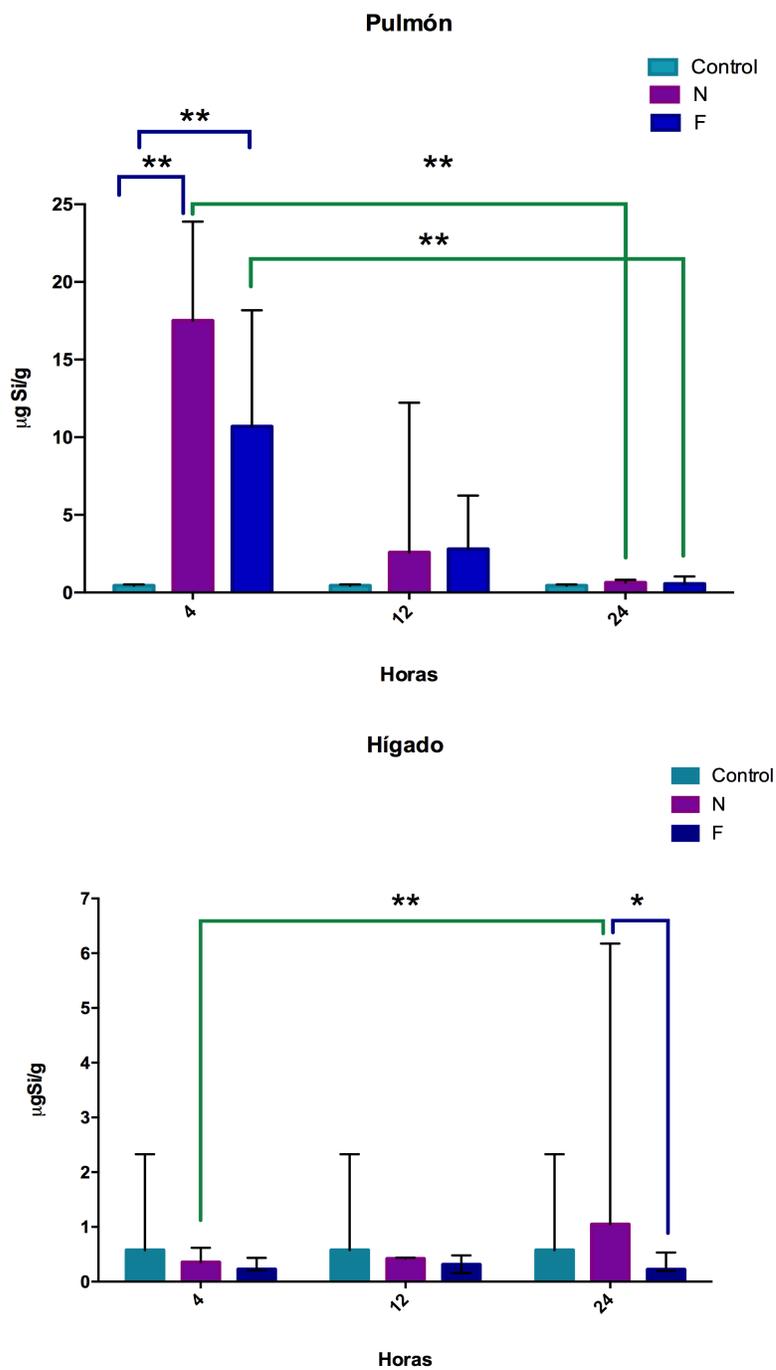


Figura 27. Concentración de Si en pulmón e hígado ($\mu\text{g/g}$). Los animales fueron administrados a una dosis única de 30 mg/kg de N) NP de SiO_2 o F) NP de SiO_2 funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 hrs. El grupo control fueron administrado con PBS y sacrificado a las 24 h. $n = 3-4$ animales por grupo. Los datos se representan como la mediana y rango. Anova de dos vías. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ estadísticamente significativo.

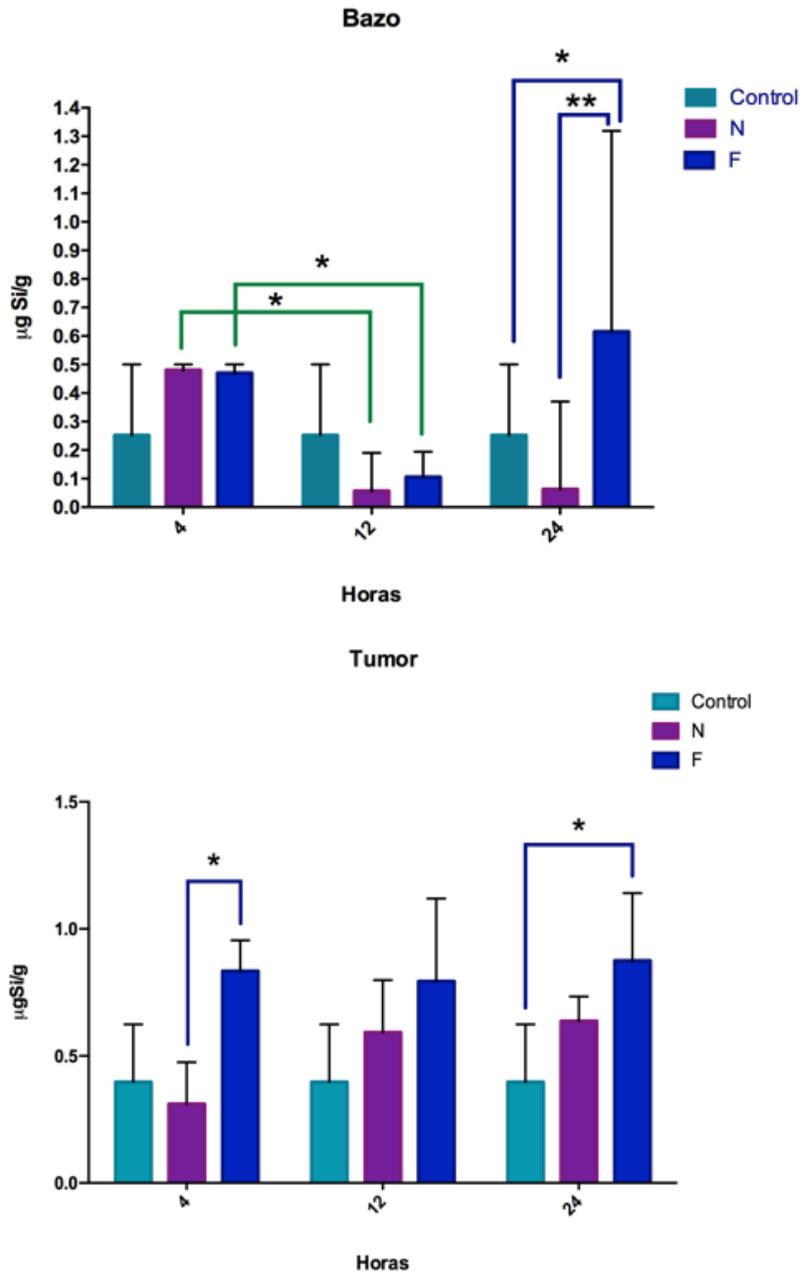


Figura 28. Concentración de Si en bazo y tumor (µg/g). Los animales fueron administrados a una dosis única de 30 mg/kg de N) NP de SiO₂ o F) NP de SiO₂ funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 hrs. El grupo control fueron administrado con PBS y sacrificado a las 24 h. n= 3-4 animales por grupo. Los datos se representan como la mediana y rango. Anova de dos vías. *p<0.05, **p<0.01 estadísticamente significativo.

En la Figura 29 se representa la concentración de Si en partes por millón (ppm) en los órganos evaluados así como en sangre de animales administrados con NP de SiO₂ y NP de SiO₂ funcionalizadas. En ambos tratamientos se observó una mayor concentración de Si en pulmón a las 4 y 12 h, y una disminución tiempo dependiente. A las 24 h, la cantidad de Si en hígado es mayor en los animales tratados con NP de SiO₂ sin funcionalizar (Figura 29A), en comparación con los animales administrados con NP de SiO₂ funcionalizados, en donde la concentración de Si se distribuyó en bazo, tumor hígado y pulmón (Figura 29B).

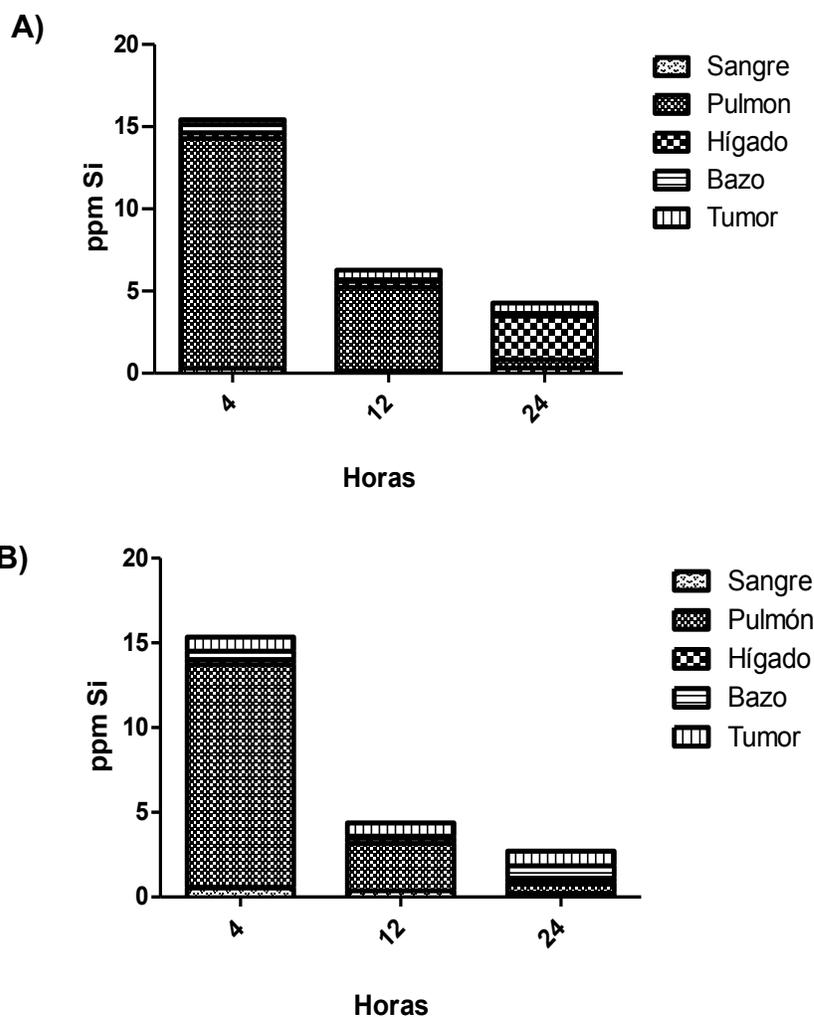


Figura 29. Concentración de Si en órganos y sangre en ppm. Los animales fueron administrados con una dosis única de 30 mg/Kg de A) NP de SiO₂ o B) NP de SiO₂ funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 h. El grupo control fue administrado con PBS y sacrificados a las 24 h.

Con la finalidad de observar si existió una preferencia por la retención de las NP de Si entre los órganos evaluados se determinó la proporción relativa del Si en cada órgano tomando el 100% como el total del Si cuantificado en los cuatro órganos (pulmón, hígado, bazo y tumor) en cada tiempo. Se observó en los animales administrados con NP de SiO₂ sin funcionalizar una mayor proporción del total de Si en pulmón a las 4 y 12 h, mientras que en hígado, bazo y tumor se cuantificó cerca del 20%. A las 24 h, la proporción que se encontraba en pulmón disminuyó considerablemente, aumentando la proporción alrededor de un 60% en hígado y cerca del 20% en tumor (Figura 30). Por otra parte, en los animales administrados con NP de SiO₂ funcionalizadas también se observó una mayor proporción en pulmón, la cual disminuyó tiempo dependiente, aumentando a las 12 y 24 horas la proporción del Si en el tumor y en el bazo (Figura 31). Esta diferencia en la proporción relativa de Si a las 24 h entre las NP de SiO₂ (en hígado) y NP de SiO₂ funcionalizadas (en tumor) indica una posible preferencia de las NP funcionalizadas hacia el tumor.

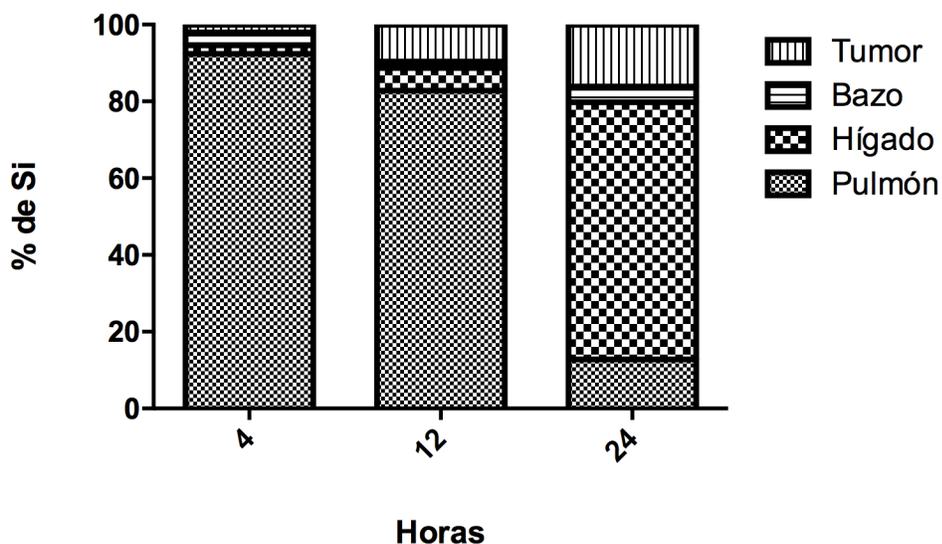


Figura 30. Proporción relativa de Si en el pulmón, el hígado, el bazo y el tumor después de la administración de NP de SiO₂ sin funcionalizar. Los animales fueron administrados a una dosis única de 30 mg/kg de NP de SiO₂ y sacrificados a las 4, 12 y 24 hrs. Los datos representan el porcentaje de Si cuantificado en cada órgano con base en el total de Si en los cuatro órganos por cada tiempo.

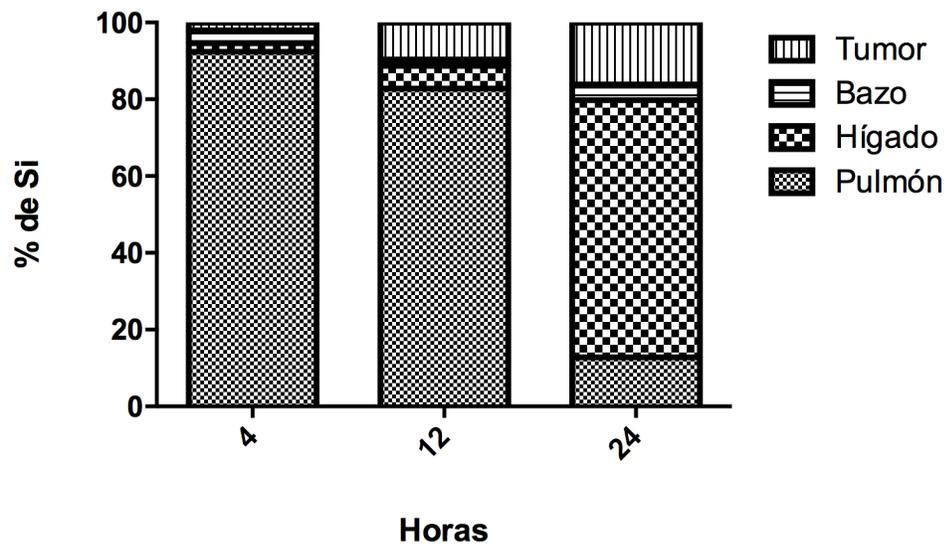


Figura 31. Proporción relativa de Si en el pulmón, el hígado, el bazo y el tumor después de la administración de NP de SiO₂ funcionalizadas. Los animales fueron administrados a una dosis única de 30 mg/kg de NP de SiO₂ funcionalizadas y sacrificados a las 4, 12 y 24 h. Los datos representan el porcentaje de Si cuantificado en cada órgano con base en el total de Si en los cuatro órganos por cada tiempo.

4 DISCUSIÓN

El objetivo general de este estudio fue evaluar la formación de la corona de proteínas de NP de SiO₂ bioconjugadas con PEG-Tf y su biodistribución en un modelo *in vivo* para determinar si las NP bioconjugadas pueden llegar al tumor en presencia de la CP. En la primera parte, las NP de SiO₂ funcionalizadas fueron sintetizadas y caracterizadas. A partir de este modelo de terapia activa, se identificó el perfil de la CP formada en plasma humano y de ratón, para finalmente determinar la biodistribución de las NP de SiO₂. A continuación, se discutirán los resultados más relevantes tales como la obtención de las NP bioconjugadas, el perfil de la corona de proteínas, las diferencias inter-especie en la CP y la capacidad de estas NP para llegar al tumor.

4.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de SiO₂.

Las NP se definen como aquellos materiales que tienen en sus tres dimensiones escala nanométrica (<100 nm). Para sintetizar NP de SiO₂ se utilizó y adaptó el protocolo descrito por Salvati et al., 2013 y Zarshcler et al., 2014 basado en el método de Stöber (Stober, 1968) que implica un balance entre el proceso de nucleación y el crecimiento de las NP. Los parámetros experimentales que definen las propiedades durante la síntesis de las NP son la temperatura, el precursor y el solvente (Ibrahim et al., 2010). Con el protocolo establecido a 25°C, TEOS 0.14 M, sin agua y con un tiempo de reacción de 20 horas se obtuvieron NP de SiO₂ semiesféricas con un tamaño aproximado de 26 ± 6.04 nm sin impurezas. La caracterización de las NP en medio acuoso también se llevó a cabo ya que las NP tienen un comportamiento coloidal en suspensión y pueden mantenerse individuales, aglomerarse o agregarse dependiendo de las fuerzas repulsivas o de Van der Waals explicadas en la teoría de Derjaguin-Landau, Verwey-Overbeek (DLVO) (Jiang et al., 2008). Dos técnicas que nos permiten determinar el diámetro hidrodinámico, la polidispersión y el potencial zeta, parámetros que definen la dispersión de NP, son el DLS y LDE. Para considerar una suspensión de NP como estable el

diámetro hidrodinámico debe ser menor a 100 nm con un PDI <0.03 y potencial zeta mayor a 30 mV y menor a -30 mV. Los valores obtenidos durante la síntesis de NP de SiO₂, 26 ± 6.04 nm nm, PDI<0.3 y potencial zeta de - 25.22 ± 4.63 mV, nos indican que sí obtenemos NP de tamaño nanométrico y de suspensión estable en agua.

4.2 Funcionalización de las nanopartículas de SiO₂.

Una vez que las NP fueron sintetizadas, éstas fueron funcionalizadas con PEG y Tf como un modelo de acarreador de fármacos para la terapia activa. El polímero PEG es considerado hasta el momento el recubrimiento estándar de mayor uso y relevancia para incrementar la solubilidad de los compuestos, disminuir la opsonización y anclar otras proteínas a la superficie de las NP. Por otra parte, la Tf es utilizada para la terapia dirigida debido a que las células tumorales sobreexpresan receptores de transferrina para obtener la gran cantidad de hierro que necesitan para su proliferación. De tal manera que la célula tumoral reconozca al complejo NP-PEG-Tf a través de su receptor a Tf y éste sea internalizado por endocitosis. La reacción para el acoplamiento de la Tf a las NP de SiO₂ se realiza a través de un PEG como ligando para ser unido con un grupo maleimido y un grupo N-hidroxisuccinimida en cada extremo, los cuales forman enlaces tióster con los grupos tiol libres de la proteína Tf y enlaces amida con los grupos amino de las NP, respectivamente (Salvati et al., 2013). Para corroborar la funcionalización de las NP con PEG y Tf se determinó la presencia de compuestos orgánicos por TGA, la pegilación (recubrimiento con PEG) de las NP al evaluar la adsorción de las NP con las proteínas del plasma y la cuantificación de proteína (Tf) presente en la dispersión de NP se llevó a cabo por el ensayo de BCA. La pérdida de masa en las NP de SiO₂ funcionalizadas en comparación con las NP de SiO₂ a temperaturas de 300-400°C y la disminución en la adsorción de proteínas en las NP funcionalizadas indica la presencia del PEG. Por último la cantidad de proteína transferrina en las NP fue de 57.48 ± 6.83 µg/mg NP. Comparando estos resultados con los valores obtenidos por Salvati et al., 2013, los valores de DH hidrodinámico en

este estudio son mayores (200 nm) a los reportados (90 nm) con un PDI mayor (0.253 en comparación con 0.09), así como a la concentración de proteína con valor menor a la reportada (60 vs 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP). Estas diferencias se deben principalmente a los procedimientos realizados en el proceso de aminación y funcionalización. En el proceso de aminación, al aplicar calor y temperatura, las NP de SiO_2 empiezan a aglomerarse. Por lo cual, el grado de aglomeración puede afectar el grado de funcionalización. Además, en este estudio las NP después de ser funcionalizadas, no fueron sonicadas para evitar el daño a la proteína. Este paso no se describe en el protocolo base, lo cual podría influir en las diferencias encontradas. Cabe resaltar que, a pesar de no obtener los mismos resultados debido a la adaptación del protocolo, las NP cumplen al tener las características como modelo de terapia (PEG y Tf) para realizar la caracterización de la CP y determinar su biodistribución en un modelo de xenotransplante.

4.3 Formación de la corona de proteínas.

Cuando las NP se encuentran en un medio biológico adsorben moléculas del medio formando la CP, complejo que interacciona con las células y que se ha propuesto como posible responsable de las respuestas biológicas ante la exposición a NP (Lynch y Dawson, 2008). Los factores que influyen en la formación de este complejo son diversos y entre estos se encuentran las propiedades fisicoquímicas, temperatura, composición del ambiente fisiológico elección de anticoagulantes y la concentración de proteínas. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas se ha observado que el tamaño influye en la adsorción de proteínas sobre la superficie de NP, es decir, proteínas como HSA, fibrinógeno, globulinas, histonas e insulina se adsorben en diferente proporción sobre la superficie de NP de oro con diferentes tamaños (5, 60 y 100 nm) (Lacerda et al., 2010). Por otra parte, diferentes perfiles de proteínas en la CP se han reportado en NP de óxido de hierro recubiertas con PVA y diferentes cargas (positiva, negativa, neutra), siendo las NP con carga neutra, aquellas que adsorben una mayor cantidad de proteínas en comparación con NP

positivas o negativas (Sakulkhu et al., 2014a). También se ha descrito que la hidrofobicidad de la NP incrementa la unión a proteínas (Cedervall et al., 2007) y que el aumento de la temperatura de incubación de 37°C a 45°C disminuye la cantidad de proteínas que se adsorben a la superficie de la NP (Mahmoudi et al., 2013).

La composición del medio fisiológico también afecta la formación de la CP y la respuesta que generan *in vitro* las NP. Por ejemplo, se ha observado con NP de Au en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementados con SFB, diferencias en la cantidad de proteína adsorbida, en donde la CP formada en medio RPMI adsorbe menos proteínas en su superficie en comparación con la CP formada en DMEM. A su vez, la exposición a NP en medio RPMI en células HeLa y U937 disminuyó la viabilidad celular en mayor porcentaje en comparación con la exposición en DMEM (Maiorano et al., 2010) debido a que la CP estable en la DMEM puede ser un factor que disminuya la internalización celular. Este efecto también se ha observado y descrito con NP de Fe₃O₄ con diferentes recubiertas (PVP, PEG y desnudas) en células THP-1, además de observar una disminución en la respuesta inflamatoria en presencia de la CP (Escamilla-Rivera et al., 2016).

El porcentaje de suero en el medio de cultivo es otro factor que influye en la identidad y cantidad de las proteínas que se adsorben en la superficie de las NP en 10 ó 50% de SFB (condiciones en estudios *in vitro* e *in vivo*) (Saha et al., 2016). El SFB es la principal fuente de proteínas para la manutención de cultivos celulares y que se forma en condiciones *in vitro*, y la más estudiada, de hecho los primeros estudios realizados determinaron la adsorción no específica de proteínas del SFB presentes en el medio de cultivo en NP de oro mediante la técnica del ensayo de ninhidrina (Chithrani et al., 2006). Sin embargo, el SFB no representa la condición real en la cual se forma la CP. En un intento por acercarse más a las condiciones reales de la CP se han utilizado suero y

plasma humano. El plasma ha demostrado ser una matriz más real al ser más completa ya que contiene a los factores de coagulación y fibrinógeno que han demostrado unirse a la superficie de diferentes NP (Mirshafiee et al., 2015; Schöttler et al., 2016). Incluso se puede observar diferencias en el perfil entre la CP formada en plasma obtenido con heparina o con citrato (Schöttler et al., 2016).

La variación del perfil de la CP de acuerdo a la fuente de proteína utilizada para su formación indica que este complejo es muy versátil. Al encontrar distintos perfiles de CP provenientes de diferentes fuentes de proteína, el concepto de “CP personalizada” (Hajipour et al., 2015) ha surgido involucrando los distintos perfiles proteómicos de pacientes con diversas enfermedades, sugiriendo que el plasma obtenido de diferentes enfermedades inducirá la formación de diferentes CP en el mismo nanomaterial. Lo anterior fue descrito por primera vez en NP de poliestireno y SiO₂ incubadas con plasma de diferentes pacientes (de diabetes, hemofilia, reumatismo, hipercolesterolemia y embarazo), en donde se observaron perfiles diferentes en la CP. Estas diferencias también se han reportado en la CP formada en la superficie de NP liposomales con plasma de pacientes que padecían cáncer de mama, cáncer gástrico y pancreático, en donde se observó que las NP incubadas con plasma de pacientes con cáncer de páncreas absorbieron mayor cantidad de proteínas en las NP, siendo las fracciones de 37 y 75 kDa las que más prevalecen; incluso también se encontró variación en el perfil de la CP formada con plasma de voluntarios sanos y plasma de los pacientes de una misma patología (Colapicchioni et al., 2016).

El concepto “CP personalizada” ha tratado de abarcar otros factores, tales como la influencia de las edades, géneros, estilos de vida y orígenes geográficos en el perfil de la CP (Corbo et al., 2017). Las diferentes entidades o componentes de la CP puede generar distintos efectos celulares, por ejemplo en células MCF-7, las NP con la CP formada de pacientes con reumatismo y talasemia indujeron mayor apoptosis en comparación con NP-CP formada en plasma de

pacientes con diabetes e hipercolesterolemia (Corbo et al., 2017). Estas CP variables, indican que la medicina contra el cáncer podría dirigirse a tratamientos personalizados de acuerdo a las características de cada paciente (Colapicchioni et al., 2016).

4.4 Perfil de la corona de proteínas y su relevancia en nanomedicina.

La interacción de los fármacos con proteínas de la sangre influye en la farmacocinética y farmacodinamia de los mismos. Sin embargo, trasladar este fenómeno a la corona de proteínas es mucho más complejo y poco comprendido. La interacción de las proteínas con la superficie de las NP dependerá de las propiedades fisicoquímicas como tamaño, carga e hidrofobicidad (Walkey y Chan, 2012) y las consecuencias de esta adsorción pueden tener diversos efectos: 1) opsonizar las NP con moléculas que pueden ser reconocidas por receptores en membranas celulares, 2) exposición de epítopes y su reconocimiento por el sistema inmune, 3) cambios conformacionales de las proteínas y 4) nucleación de las mismas (Nel et al., 2009). A pesar de que se ha estudiado la composición de la CP en NP desnudas y se han propuesto las interacciones fisicoquímicas que rigen este complejo, la composición de la CP en NP para la terapia activa es aún desconocida y los factores que rigen su formación son todavía más inciertos. Como se mencionó anteriormente, la nanotecnología ha desarrollado polímeros, como el PEG, para disminuir la adsorción de proteínas, y así hacer más eficientes los tratamientos o usos de las NP en medicina. En el caso de la terapia activa el uso de polímeros de anclaje como el PEG de cadena corta, es necesario para mantener la conformación de la proteína que será reconocida por la célula tumoral (Salvati et al., 2013). En las NP de SiO₂-PEG-Tf se observó una disminución de la adsorción de proteínas en comparación con las NP de SiO₂ desnudas, pero esta unión no es inevitable.

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar las diferencias inter-especie de la CP ya que la evaluación de las respuestas biológicas se estudian en modelos murinos para trasladar esos conocimientos a las condiciones reales de tratamiento. Se observó que la cantidad de proteínas presentes en la corona de NP formada en plasma de ratón fue menor en comparación con la CP formada en plasma humano. Aún con esta disminución, entre ambas matrices se comparten el 24.7% de las proteínas identificadas y estas proteínas forman parte del adsorboma en donde se encuentran proteínas de transporte de iones, coagulación, complemento y transporte de iones (Walkey y Chan, 2012). Otros procesos biológicos implicados son la vía de señalización mediada por integrinas, la regulación del citoesqueleto de actina, el metabolismo de los nucleótidos trifosfato y vías de señalización GTPasas. Algunas proteínas específicas que se identificaron son las apolipoproteínas, factores de coagulación, complemento, fibrinógeno, vitronectina, factor Von Willebrand y antitrombina. Esto indica que estas NP pueden activar principalmente la respuesta inmune y la coagulación con posibles efectos adversos como la anafilaxia y la coagulopatía intravascular diseminada (Ilinskaya y Dobrovolskaia, 2014). Por otra parte, proteínas como inmunoglobulinas y apolipoproteínas podrían ser utilizadas para modificar el transporte de las NP a órganos con células que reconozcan dichas moléculas como el hígado y bazo.

Se ha sugerido que la interacción de las NP con proteínas puede mediar las interacciones celulares y las respuestas biológicas. Además, las proteínas adsorbidas en la superficie de las NP pueden sufrir cambios conformacionales, los cuales pueden provocar la pérdida de la función, agregación proteica y la presentación de nuevos epítopes. Por lo tanto, el conocer el perfil de la CP nos permite predecir los procesos biológicos que podrían ser activados por la exposición a las NP. En general, las proteínas adsorbidas en las NP pertenecen al adsorboma son: albúmina, apolipoproteínas, factores de coagulación, complemento, fibrinógeno, entre otras. Aunque no hay evidencia de la asociación entre la exposición a NP y enfermedades, la exposición a éstas podría contribuir al desarrollo de algunas patologías. Por ejemplo, una

disminución de la actividad de la enzima α -2-macroglobulina, que media la degradación de la proteína β -amiloide está asociada a un incremento en el riesgo de la enfermedad del Alzheimer (Zamani et al., 2016). Una reducción de la proteína talina ha sido asociada con cardiopatías (Bogatan et al., 2015) y la alteración en las proteínas B es relacionada a hipercolesterolemia y a un incremento del riesgo de aterosclerosis (Andersen et al., 2016). Considerando que la adsorción de proteínas en las NP puede influenciar la farmacocinética y farmacodinamia, la CP podría determinar las respuestas biológicas de las NP. Sin embargo, este proceso es mucho más complejo en las NP debido a sus propiedades fisicoquímicas. Si bien la nanotecnología se ha enfocado en el desarrollo de polímeros que disminuyan la adsorción de proteínas, el nuevo enfoque de utilizar a la CP para estos propósitos podría mejorar la eficiencia y eficacia de las NP (Zanganeh et al., 2016).

4.5 Diferencias inter-especie en el plasma humano y de ratón.

A pesar del gran desarrollo de las nanomedicinas aún no se ha logrado el éxito en su comercialización, una de las causas que se sugiere son las discrepancias que existen entre las respuestas a las nanomedicinas en los estudios preclínicos y clínicos. El poco éxito de algunos fármacos se registró en el periodo entre 1969 y 2005, en el cual cerca del 10 al 20% de los fármacos fueron retirados de la clínica debido a los efectos inmunotóxicos que se presentaron en pacientes, tales como la anafilaxis, alergias, reacciones de hipersensibilidad y de idiosincrasia e inmunosupresión (Dobrovolskaia, 2015).

Considerando a la CP como la identidad responsable de los efectos biológicos de las NP, es importante considerar las diferencias inter-especie en la formación de la CP como la posible guía para entender algunas de las incongruencias entre los resultados que provienen de los estudios preclínicos y clínicos. En estudios preclínicos, el principal modelo animal utilizado para la evaluación de la toxicidad de NP son los roedores, siendo el ratón el más considerado debido a las similitudes que tiene con el humano, ya que se

conoce que cerca del 90% del genoma de humano y de ratón presentan sintenia y los genes ortólogos tienen 78.5% de identidad (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Sin embargo, existen diversos estudios que se han enfocado en describir las diferencias entre el humano y el ratón, principalmente en el sistema inmunológico y en el proceso de coagulación. Por ejemplo, en el sistema inmune, se han descrito diferencias entre humano y ratón tanto en la fase innata como en la fase de adaptación (Mestas y Hughes, 2017), entre las que se encuentran, diferencias en la expresión y procesamiento de las defensinas, expresión de TLR's y NO sintasa inducible en macrófagos (inmunidad innata), expresión de FcR e isotipos Ig, desarrollo de células B, desarrollo y regulación de células T (Mestas y Hughes, 2017). Los resultados obtenidos en este estudio indican diferencias en el perfil de la CPH y CPR. En la CPH se encontró una mayor proporción de inmunoglobulinas, actina citoplasmática, ficolina-3, complemento C3 y apolipoproteína.

Las inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas compuestas de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas tienen dominios variables para la unión de antígenos y dominios constantes que tienen la función efectora específica como la activación del complemento o la unión a receptores Fc (Schroeder et al., 2010). Su papel en la adsorción específica sobre la superficie de las NP ha mostrado la activación del complemento y la activación de fagocitosis por macrófagos (Mirshafiee et al., 2016). Estudios que han demostrado que la adsorción específica de inmunoglobulinas sobre la superficie de las NP promueve su fagocitosis y en nanopartículas de óxido de hierro proveen un andamio para la fijación del complemento y la activación del mismo (Banda et al., 2014).

Así mismo, el papel del complemento en la adsorción de proteínas ha tomado gran interés debido a las reacciones observadas en algunos tratamientos con nanomedicinas. Por ejemplo, el DOXIL[®] puede ocasionar efectos severos después de la administración relacionados a la activación del complemento, lo

cual se ha observado hasta en un 10% de los pacientes que lo han recibido (Jobrown et al., 2011), este mismo efecto fue observado con NP de óxido de hierro para contraste en imagenología por resonancia magnética (Banda et al., 2014) .

El complemento compone cerca del 5% de las globulinas del suero y se encarga del reconocimiento y eliminación de los patógenos. Se compone de más de 30 proteínas que están implicadas en la respuesta inmune no específica que pueden ser activadas dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las NP. La activación del complemento se lleva a cabo por tres vías: vía clásica, vía de lectina y vía alterna. La vía clásica inicia por la unión de IgG o IgM a la superficie del patógeno, seguido de la unión y activación de C1q y formación de C4bC2a que corta C3 en C3a y C3b. En la vía alterna, la superficie del patógeno crea el ambiente para la activación del complemento para formar C3b por la acción de la C3bBb y en la vía de lectinas interviene la unión de lectinas de unión a la manosa (MBL) (Banda et al., 2014).

De manera importante, la vía de lectina es diferente en el ratón y el humano. En el ratón la activación inicia por la unión de la manosa A y C o ficolina A a los carbohidratos de la superficie del patógeno llevando a la activación de MASP-2 y la formación de C4bC2a (C3 convertasa). En el humano, cinco moléculas diferentes de reconocimiento a carbohidratos han sido identificados para iniciar la vía de lectina: MBL, M-, L- y H- ficolinas, colectina 11, y el proceso a partir de la C3 convertasa es similar en humanos y ratones. Además de esa diferencia, la vía clásica en el ratón parece no tener una gran contribución a diferencia del humano (Banda et al., 2014). En el caso de las NP de SiO₂ funcionalizadas, la activación puede estar mediada a través del complemento C3 y ficolina 3, elementos no presentes en la CPR, lo cual podría verse reflejado en una fuerte diferencia en cuanto a la activación del complemento por exposición a NP en estudios preclínicos y clínicos.

Otras moléculas que juegan un papel importante son las apolipoproteínas, proteínas encargadas del metabolismo y transporte del colesterol de los tejidos hacia el hígado constituyendo una proteína estructural en las lipoproteínas de alta densidad (High-density lipoprotein, HDL). La apolipoproteína A-I es importante para reducir los riesgos de enfermedades cardiocoronarias e interactúa con la aciltransferasa de colesterol lecitina (Lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT), transportadores ABC, y la proteína transportadora de fosfolípidos (phospholipid transporting protein, PLTP). Su adsorción en NP de poliestireno ha demostrado cambiar su estructura dependiendo de la carga, con aquellas NP de carga positiva afectan más su estructura que las cargas negativas (Cukalevski et al., 2011). Su adsorción en la superficie de las NP de SiO₂ funcionalizadas podría influir en su biodistribución a hígado y a cerebro. En contraste con la CPH, el perfil de la CPR presenta en mayor abundancia a las proteínas inhibidor de serina proteasa A3K, serotransferrina, alfa 1 antitripsina y fibrinógeno. La proteína inhibidor de serina proteasa A3K, también conocida como proteína de unión a calicreína tiene como función inhibir a la calicreína tisular con efectos antiangiogénicos, anti-inflamatorios, antifibrótico (Lin et al., 2018); la serotransferrina es una proteína transportadora de hierro; la alfa 1 antitripsina es un inhibidor de la elastasa leucocitaria con función protectora del conectivo de las paredes alveolares (Beatriz et al., 2015); y el fibrinógeno es el precursor de la fibrina para la formación de coágulos (Weisel, 2005).

A pesar de que la información que proporciona la CP *in vitro* es útil para predecir los efectos biológicos, es necesaria la estandarización de los protocolos para evaluar la CP *in vivo*, así como el papel de la corona suave y la influencia de los lípidos en los efectos biológicos (Sakulku et al., 2014b; Hadjidemetriou et al., 2016).

Las proteínas que están implicadas en las diferencias inter-especie son parte de los marcadores más comunes de toxicidad aguda de las NP como la hemólisis,

activación del complemento, trombogénesis, pirogenicidad e inducción de citocinas (Dobrovolskaia, 2015), lo que indica que las repuestas relacionadas a la respuesta inmune y a la coagulación pueden ser subestimados o sobrestimados, respectivamente, en los estudios preclínicos. Su interpretación y extrapolación hacia la clínica debe ser tomada en consideración.

4.6 Biodistribución de las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas.

Para conocer la biodistribución y capacidad de las NP de SiO₂ funcionalizadas de llegar al tumor, se realizó la cuantificación de Si en sangre, hígado, bazo, pulmón y tumor de animales administrados con NP de SiO₂ y NP de SiO₂ funcionalizadas. Al no tener estudios sobre la distribución de estas NP se administró una sola dosis de 30 mg/kg (dosis reportada anteriormente con NP de SiO₂) y se determinó la cuantificación de Si a las 4, 12 y 24 h. Para determinar si la bioconjugación permite la llegada de las NP de SiO₂, aún en presencia de la CP, se comparó esta biodistribución con NP de SiO₂ sin funcionalizar. En los resultados se observó en forma general que los niveles de Si en los animales tratados con NP SiO₂ sin funcionalizar eran más bajos que las concentraciones de Si en animales tratados con NP de SiO₂ funcionalizadas.

En ambas NP la concentración de Si fue mayor en el pulmón a las 4 y 12 h, posteriormente la concentración disminuyó a las 24 h, tiempo en el cual la proporción relativa de Si fue mayor en hígado para aquellos animales administrados con NP de SiO₂ sin funcionalizar en comparación con los animales tratados con NP de SiO₂ funcionalizadas con una distribución más homogénea en bazo, tumor y pulmón.

Las etapas de la cinética de un compuesto en el organismo constan de la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación. En la nanomedicina se pretende que las NP sean administradas por vía intravenosa para garantizar que la dosis alcance niveles plasmáticos rápidos y su eficacia sea más efectiva.

Una vez en las venas, las NP retornan al corazón a través de las venas pulmonares, siendo el pulmón el primer órgano blanco rico en macrófagos, tal como lo observamos en nuestros resultados con ambos tratamientos, 17.5 (0.536-23.88) $\mu\text{g/g}$ y 10.60 (1.832-18.17) $\mu\text{g/g}$ para NP de SiO_2 y NP de SiO_2 funcionalizadas, respectivamente. Sin embargo, la concentración de Si disminuyó a las 12 y 24 horas, lo cual indica que éstas regresaron a la circulación para su eliminación o redistribución a otros órganos.

Esto concuerda con resultados ya reportados, en donde la mayoría de los casos, los órganos con mayor acumulación de NP desnudas son el hígado, seguido del bazo, nódulo linfático y médula ósea, órganos con gran cantidad de macrófagos que son parte del sistema mononuclear fagocítico y que capturan las NP a través del receptor basurero y la adsorción de opsoninas en su superficie como el fibrinógeno. Además, el potencial zeta de las NP (-18 mV) favorece su estado de agregación, lo cual favorece la fagocitosis. Otro factor que ayuda a la acumulación de NP en estos órganos es el tipo de endotelio. A diferencia algunos fármacos que pueden difundir a través de la pared del endotelio, se ha propuesto que las NP, de acuerdo a su tamaño, podrían pasar a través de las aberturas que se encuentran en el endotelio en los capilares fenestrados y/o sinusoidales, siendo el hígado, bazo y médula ósea aquellas regiones con endotelio discontinuo (Landsiedel et al., 2012). Aunque en ambos tratamientos se encontró Si en hígado a las 24 horas, las NP de SiO_2 no funcionalizadas fueron retenidas en mayor proporción en este órgano en comparación con las NP de SiO_2 funcionalizadas. Lo anterior se puede deber a la presencia de PEG, el cual disminuye la adsorción de proteínas que pueden ser reconocidas por los macrófagos en el hígado (Knop et al., 2010).

La disminución en la concentración de Si en ambos tratamientos a las 4, 12 y 24 h indica una posible eliminación vía renal. En teoría, sólo NP con un tamaño menor a 8 nm y con carga positiva pueden pasar el glomérulo capilar. Sin embargo, se ha reportado que NP de SiO_2 con diámetros mayores (45 nm)

pueden ser eliminadas por esta vía (He et al., 2008). Reportes sobre otras NP han demostrado la eliminación de éstas. En ratas Wistar expuestas vía oral a NP de Bi_2O_3 (246 nm DH) a una dosis de 50/mg/kg/d se encontraron altas concentraciones de Bi en orina y riñón al día 28 (Gómez, 2016). También se ha descrito la eliminación de NP de Ag con DH de 200 nm en una exposición dosis única de 5 mg/Kg en ratas Wistar. El mecanismo de interacción de las NP con el epitelio renal es aún desconocido (Lavicoli et al., 2016). En la exposición a NP de SiO_2 mesoporosa, con tamaños mayores a 80 nm, se ha observado alteraciones en la estructura glomerular y fibrosis intersticial renal (Chen et al., 2015; Li et al., 2015), por lo tanto, un daño en el glomérulo podría permitir el paso de las NP independientemente de su tamaño.

Aun cuando no se determinó la concentración de Si en cerebro, se ha descrito que NP de 199 nm, recubiertas específicamente de apolipoproteínas, pueden ser endocitadas y alcanzar niveles detectables en este órgano. Dichas NP fueron encontradas en el bulbo olfatorio, corteza, hipocampo y cerebelo, no encontrando NP sin apo-E en cerebro, lo cual podría ser de interés para estudios posteriores en el desarrollo de NP para la terapia contra tumores cerebrales (Landsiedel et al., 2012)

Las concentraciones de Si en el tumor, en ambos tratamientos, no fue más alta que las concentraciones de Si encontradas en bazo, hígado y pulmón. Sin embargo a las 24 horas, se encontró mayor cantidad de Si en hígado en el tratamiento con NP de SiO_2 con respecto a las NP de SiO_2 funcionalizadas, y a este mismo tiempo, la concentración de Si en tumor fue mayor en NP de SiO_2 funcionalizadas con respecto al control. Esta preferencia por el hígado o el tumor, también se observa en la proporción relativa de Si, ya que en animales tratados con NP de SiO_2 no funcionalizadas la proporción relativa fue mayor en hígado, a diferencia de los animales tratados con NP de SiO_2 funcionalizadas en donde la proporción de Si encontrado en bazo y tumor fue mayor a las 24 h.

Parte de este resultado podría deberse al direccionamiento de la NP hacia el tumor a través de la transferrina. No obstante, la distribución de las NP al tumor también es determinada por la estructura e irrigación de éste, así como del fenómeno de permeabilidad y retención (EPR). Este fenómeno consiste en una microvasculatura desordenada, pobre drenaje linfático, para que una NP pueda llegar al tumor a través de este efecto, el tiempo de vida media en circulación debe ser lo suficientemente largo para acumular una cantidad suficiente de NP en el tumor (Nakamura et al., 2016).

Los hallazgos en este estudio aportan nuevo conocimiento a la formación de la corona de proteínas y al posible uso de las NP de SiO₂ funcionalizadas en el área de nanomedicina. Después de que la CP fue descrita y propuesta como la entidad responsable de las respuestas biológicas de las NP, el estudio sobre ésta ha aumentado en diversas áreas tratando de describir mejor las bionano-interacciones. Este trabajo se enfocó en un aspecto que había sido ignorado, las diferencias inter-especie de la CP. Como resultado encontramos claras diferencias inter-especie por lo que se sugiere la inclusión de la caracterización de la CPH en los estudios preclínicos y clínicos como una estrategia para la extrapolación de los resultados, así como la necesidad de generar protocolos para elegir el mejor medio para la formación de la CP. Por otra parte, la biodistribución de las NP de SiO₂ funcionalizadas indican que es posible un direccionamiento hacia las células tumorales y conociendo el perfil de su CP es necesario enfocar los estudios nanotoxicológicos hacia las respuestas inmunológicas y la coagulación para el diseño de NP seguras.

5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron NP de SiO₂ funcionalizadas con PEG y Tf como modelo de terapia activa que mostraron una biodistribución en pulmón, hígado, bazo y tumor, con una eliminación probablemente vía renal. Se observó una diferencia en la cantidad de Si encontrada en tumor a las 24 h entre los tratamientos con NP de SiO₂ y las NP de SiO₂ funcionalizadas, siendo mayor para aquellas que fueron bioconjugadas, lo que indica que la funcionalización, aún en presencia de la corona de proteínas, permite que dichas NP alcancen el tumor.

Las proteínas más abundantes encontradas en el perfil de la corona de proteínas en humano son inmunoglobulinas, actina citoplasmática 1, hemoglobina subunidad beta, serotransferrina, ficolina-3, complemento C3 y apolipoproteína A-1. En contraste, las proteínas inhibidor de proteasa serina A3K, serotransferrina, alfa-1-antitripsina, hemoglobina subunidad beta y fibrinógeno, fueron adsorbidas en mayor abundancia en la corona de proteínas de ratón.

Aun cuando no se midieron respuestas biológicas en el modelo de xenotransplante, el perfil de la corona de proteínas indica que las respuestas encontradas en la corona de proteínas de humano relacionadas a respuesta inmune, coagulación y transporte de lípidos, podrían ser subestimadas en los estudios preclínicos debido a las diferencias inter-especie encontradas entre las coronas formadas en plasma de humano y de ratón.

Es evidente que los modelos preclínicos no pueden ser reemplazados, sin embargo, debido a las diferencias inter-especie encontradas en este modelo de terapia activa, se propone incluir, como una estrategia, la caracterización de la CP en los estudios preclínicos para garantizar el éxito en el traslado de los resultados encontrados en esta fase a la clínica.

6 PERSPECTIVAS

- Evaluar la internalización celular de las NP de SiO₂ funcionalizadas sin y con corona de proteínas en células tumorales.
- Evaluar la respuesta biológica de la CP en las NP de SiO₂ funcionalizadas *in vitro* e *in vivo*: coagulación, respuesta inmune y translocación.
- Determinar cambios estructurales de las proteínas más abundantes en la CPH de las NP de SiO₂ funcionalizadas.
- Evaluar la eficiencia de las NP de SiO₂ funcionalizadas sin y con CP.
- Cuantificar la concentración de Si en los órganos riñón, cerebro, corazón y vejiga.
- Determinar la biodistribución de las NP de SiO₂ funcionalizadas con dosis repetidas a tiempos más largos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, N., Anderson, N. (2002). The human plasma proteome. History, character and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics* 1(11): 845-67.
- Aggarwal P, Hall J, McLeland C, Dobrovolskaia M, McNeil S. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 428-437.
- Alexis F, Pridgen E, Langer R, y Farokhzad O. C. (2010). *Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy*. Handbook of Experimental pharmacology. *Drug Delivery*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3>.
- Andersen L, Miserez R, Ahmad Z, y Andersen R. L. (2016). Familial defective apolipoprotein B-100 : A review. *Journal of clinical lipidology* 10:1297–1302.
- Argmann C, Auwerx J. (2006). Collection of blood and plasma from the mouse. *Current Protocols in Molecular Biology* 29A.3.1-29A3.4.
- Bajaj A, Samanta B, Yang H, Jerry J, Rotello V. (2009). Stability, toxicity and differential cellular uptake of protein passivated-Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 19: 6328-6331.
- Banda N. K., Mehta, G., Chao, Y., Wang, G., Inturi, S. et al. (2014). Mechanisms of complement activation by dextran-coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoworms in mouse versus human serum. *Particle and Fibre Toxicology* 11(1), 1–10.
- Bauer, A., Strozyk, E., Gorzelanny, C., Westerhausen, C., Desh, A., Schneider, M. et al. (2011). Cytotoxicity of silica nanoparticles through exocytosis of von Willebrand factor and necrotic cell death in primary human endothelial cells. *Biomaterials* 32(33): 8385-8393.
- Beatriz, P., Fernández, M., López, O., Giugno, E., Pace, S., Livellara, B. (2015). Déficit de alfa 1 antitripsina en pacientes con EPOC : estudio de corte transversal. *Archivos de bronconeumonía* 51(11): 539–543.
- Berry, C., Curtis A. (2003). Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Institute of physics publishing* 36: R198-R206.
- Bogatan, S., Cevik, D., Demidov, V., Vanderploeg, J., Panchbhaya, A., Vitkin, A., y Jacobs, J. R. (2015). Talin Is required continuously for cardiomyocyte remodeling during heart growth in *Drosophila*. *PLoS ONE* 10 (6): 1–16.
- Borak, B., Biernat, P., Prescha, A., Baszczuk, A., Pluta, J. (2012). In Vivo Study on the Biodistribution of Silica Particles in the bodies of rats. *Advanced clinical experimental medicine* 21 (1): 13-18.
- Caracciolo, G., Farokhzad, O. C., Mahmoudi, M. (2016). Biological Identity of Nanoparticles In Vivo : Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.011>.

- Card J, Zeldin D, Bonner J, Nestmann E. (2008). Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 295: L400-11.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H. Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(7): 2050–5.
- Chen, M, von Mikecz A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Experimental Cell Research* 305: 51-62.
- Chen, X., Zhouhua, W., Jie, Z., Xinlu, F., Jinqiang, L., Yuwen, Q et al. (2015). Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway. *International Journal of Nanomedicine* 10:1–22.
- Chithrani, B, Ghazani A, Chan W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* 6: 662-668.
- Choi, S., Oh, J., Choy, J. (2009). Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(3): 463–471.
- Colapicchioni, V., Tilio, M., Digiacomio, L., Gambini, V., Palchetti, S., Caracciolo, G. (2016). The International Journal of Biochemistry Personalized liposome – protein corona in the blood of breast , gastric and pancreatic cancer patients. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 75: 180–187.
- Corbo, C., Molinaro, R., Tabatabaei, M., & Farokhzad, C. (2017). Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomaterials Science* 5: 378–387.
- Cukalevski, R., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Linse, S., Cedervall, T. (2011). Structural Changes in Apolipoproteins Bound to Nanoparticles. *Langmuir* 47:14360–14369.
- Daniels, Delgado T, Rodríguez J, Helguera G, Penichet M. (2006).The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clinical immunology* 121: 144-158.
- Daniels, Bernabeu E, Rodríguez J, Patel S, Kozman M. (2012). The transferring receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820: 291-317.
- Deng, Z, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D. et al. (2009). Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20: 1-9.
- Desai, N. (2008). Nab technology: A drug delivery platform utilizing endothelial gp60 receptor-based transport and tumour-derived SPARC for targeting. En Drug delivery report winter. PharmaVentures Ltd.
- Dobrovolskaia, M. A. (2015). Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy.

Journal of Controlled Release 220: 571–583.

- Donaldson, K, Stone V, Tran C, Kreyling W, Borm, P. (2004). Nanotoxicology. *Occupational Environmental Medicine* 61: 727-728.
- Drugs. Disponible en: <https://www.drugs.com> Consultado: Enero 2018.
- Egerton, R. (2005). Physical Principles of Electron Microscopy An introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer Science+Business Media, Inc. U.S.A.
- Ehrenberg, M, Friedman A, Finkelstein J, Oberdörster G, McGrath J. (2009). The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30: 603-610.
- Elias, J., Gygi, P. (2007). Target -decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4:207-214.
- Escamilla-rivera, V., Uribe-ramírez, M., González-pozos, S., Lozano, O., Lucas, S. De Vizcaya Ruiz. (2016). Protein corona acts as a protective shield against Fe₃O₄ -PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. *Toxicology letters* 240: 172–184.
- Etheridge, M., Campbell, S., Erdman, A., Haynes, C., Wolf, S., McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine* 9(1): 1-14.
- Fernández-Lainez, C., Vela-Amieva, M., Ibarra-González, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex* 30(5): 258–263.
- Goldberg, M. S., Hook, S. S., Wang, A. Z., Bulte, J., Patri, A., Uckun, F et al. (2013). Biotargeted nanomedicines for cancer: six tenets before you begin. *Nanomedicine* 8(2): 299–308.
- Goldstein J, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E. (2003). Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis. 3^{era} edición. Springer. E.U.A.
- Gómez, X. (2016). Evaluación in vivo de la nefrotoxicidad y distribución renal por la exposición a nanopartículas de trióxido de bismuto. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México.
- Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Kostarelos, K. (2016). Time-evolution of in vivo protein corona onto blood-circulating PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL) nanoparticles. *Nanoscale* 8(13):6948–6957. <http://doi.org/10.1039/C5NR09158F>
- Hajipour, M. J., Laurent, S., Aghaie, A., Rezaee, F. Mahmoudi, M. (2014). Personalized protein coronas: a "key" factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science* 2:1210–1221.
- Hajipour, M. J., Raheb, J., Akhavan, O., Arjmand, S., Mashinchian, O., Rahman, M. (2015). Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale* 7:8978-8994.
- He, X., Nie, H., Wang, K., Tan, W., Wu, X., Zhang, P. (2008). In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 80(24): 9597–9603.

- Head, J. F., Wang, F. E. N., Elliott, R. L. (1997). Drugs that interfere with iron metabolism in cancer cells. *Advances in enzyme regulation* 37(96): 147–169.
- Hillaireau, H, Couvreur P.(2009). Nanocarrier's entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2873-2896.
- Hou, Y., Lai, M., Chen, X., Li, J., Hu, Y., Luo, Z. (2013). Effects of mesoporous SiO₂, Fe₃O₄, and TiO₂ nanoparticles on the biological functions of endothelial cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A..* <http://doi.org/10.1002/jbm.a.34839>
- Hu, L., Mao Z, Zhang Y, Gao C. (2011). Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells. *Journal of Nanoscience Letters* 1: 1-16.
- Hu, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Wu, R., Zou, H. (2014). Nanoparticle size matters in the formation of plasma protein coronas on Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121, 354–361.
- Iavicoli, I., Fontana, L., Nordberg, G. (2016). The effects of nanoparticles on the renal system. *Critical Reviews in Toxicology* 46(6): 490-560.
- Ibrahim, I. A. M., Zikry, A. A. F., Sharaf, M. A. (2010). Preparation of spherical silica nanoparticles : Stober silica. *Journal of American Science* 6(11): 985–989.
- Izak-Nau E, Voetz M, Eiden S, Duschl A, Puntès V. (2013). Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Particle and Fibre Toxicology* 10:56.
- Jiang, J, Oberdörster G, Biswas P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* 11:77-89.
- Jin, S., Jin, H., Hong, S. (2014). Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy : From Cells to Clinics. *BioMed Research International.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/814208>
- Jobrown, E. (1991). Complement receptors and phagocytosis. *Current Opinion in immunology* 3:76–82.
- Jokerst J, Lobovkina T, Zare R, Gambhir S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* 6(4): 715-728.
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D. Mallick, P. (2008). ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 24:2534-2536.
- Kim, G. Nie S. (2005). Targeted cancer nanotherapy. *Nanotoday* 28-33
- Kim, H, Andrieux K, Gil S, Taverna M, Chacun H. et al. (2007). Translocation of poly(ethyleneglycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor mediated endocytosis. *Biomacromolecules* 8: 793-799.
- Knop, K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert U. (2010). Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie International* 49: 6288-6308.

- Kreuter, J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S. et al. (2007). Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *Journal of Controlled Release* 118: 54-58.
- Lacerda, S. H. D. P., Park, J. J., Meuse, C., Pristiniski, D., Becker, M. L., Karim, A., & Douglas, J. F. (2010). Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACSNano* 4(1): 365–379.
- Landsiedel, R, Fabian E, Ma-Hock L, Wohlleben W, Wiench K. (2012). Toxicokinetics of nanomaterials. *Archives of toxicology* 86:1021-1060.
- Lee, J., Kim, M., Paek, H., Kim, Y., Kim, M., Lee, J. (2014). Tissue distribution and excretion kinetics of orally administered silica nanoparticles in rats. *International Journal of nanomedicine* 9: 251–260.
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M. P., Christoffer, A., Dawson, K., Salvati, A. (2012). Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACSNano* 7(6): 5845–5857.
- Li, Linlin., Liu, T., Fu, C., Tan, L., Meng, X., Liu, H. (2015). Biodistribution , excretion , and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11(8): 1915–1924.
- Li, M., Al-jamal, K. T., Kostarelos, K., Reineke, J. (2010). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *ACSNano* 4(11): 6303–6317.
- Li, Y., Fujita, M., & Boraschi, D. (2017). Endotoxin Contamination in Nanomaterials Leads to the Misinterpretation of Immunotoxicity Results. *Frontiers in Immunology* 8:1–7.
- Lin, W, Huang Y, Zhou X, Ma Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217: 252-259.
- Lin, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Zhou, T., Li, J., Luo, P. (2018). Serine Protease Inhibitor A3K Suppressed the Formation of Ocular Surface Squamous Metaplasia in a Mouse Model of Experimental Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55(9):5813-5820.
- Liu, J., Yu, M., Zhou, C., Zheng, J. (2013). Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. *Materials Today* 16(12): 477–486.
- Liu, Y, Miyoshi H, Nakamura M. (2007). Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer* 120:2527-2537.
- Ilinskaya, A., Dobrovolskaia, M. (2014). Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: Safety concerns. *Nanomedicine* 8(6): 969–981.
- Lundqvist, M, Stigler J, Cedervall T, Berggard T, Flanagan M. et al. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACSNano* 5: 7503-7509.
- Lynch, I, Dawson K. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* 3: 40-47.
- Mahmoudi, M., Abdelmonem, A. M., Behzadi, S., Clement, J. H., Dutz, S.,

- Ejtehadi, M. R. et al. (2013). Temperature: The “ Ignored ” Factor at the NanoBio Interface *ACS Nano* 6555–6562.
- Maiorano G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A. et al. (2010). Effects of Cell Culture Media on the Protein Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response *ACS Nano* 4(12), 7481–7491.
 - Mansfield, E., Tyner, K. M., Poling, C. M., Blacklock, J. L. (2014). Determination of Nanoparticle Surface Coatings and Nanoparticle Purity Using Microscale Thermogravimetric Analysis. *Analytical chemistry* 86: 1478-1448.
 - Maynard, A., Michelson, E. (2012). The Nanotechnology Consumer Products Inventory. Project on emerging nanotechnologies. Disponible en: http://www.nanotechproject.org/process/files/2753/consumer_product_inventory_analysis_handout.pdf
 - McIlwain, S., Tamura, K., Kertesz-Farkas., Grant, C., Diament, B., Frewen, B, et al. (2014). Crux: Rapid open source protein tandem mass spectrometry analysis. *J. Proteome Res* 13: 4488-4491.
 - Mestas, J., Hughes, C. C. W. (2017). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *Journal of immunology* 172(5): 2731-8.
 - Ming, Z. M., Li, H., Sun, H., Ho, K. (2002). Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews* 54(4): 561–587.
 - Mirshafiee, V., Kim, R., Mahmoudi, M., & Kraft, M. L. (2015). The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis in vitro: human plasma vs . human serum. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 75: 188-95.
 - Mirshafiee, V., Kim, R., Park, S., Mahmoudi, M., & Kraft, M. L. (2016). Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials* 75, 295–304.
 - Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. (2001). Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice. *Pharmacology reviews* 53(2): 283–318.
 - Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature Publishing Group* 420: 520-562.
 - Nanocomposix. Disponible en: <https://nanocomposix.com/pages/silica-physical-properties>. Consultado: Enero 2018.
 - Napierska, D., Thornassen L, Lison D, Martens J, Hoet P.(2010).The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* 7:39
 - Nakamura, Y., Mochida, A., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2016). Nanodrug Delivery : Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer ? *Bioconjugate Chemistry* 27:2225-2238.
 - National Cancer Institute. Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-nanoparticle-paclitaxel>. Marzo, 2014

- National Nanotechnology Initiative of the U.S. National. Disponible en: <http://www.nano.gov/>. Enero 2014.
- Nel, A., Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek E. et al. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*. 8:543-557.
- Nel, A., Xia T, Mädler L, Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622- 627.
- Nichols, J. W., Han, Y. (2012). Odyssey of a cancer nanoparticle : From injection site to site of action. *Nano Today* 7: 606–618.
- Oberdörster, G. Oberdörster E, Oberdörster J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspective* 113: 823-839.
- Park, Smith J, Pham T, Whitaker R, Sucato C. et al. (2014). Effect of PEG molecular weight on stability, T2 contrast, cytotoxicity, and cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 119: 106-114.
- Phillips E, Penate-Medina O, Zanzonico P, Carvajal R, Mohan P, et al. (2014). Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET *Sci Transl Med* doi: 10.1126/scitranslmed.3009524
- Rahman, M. Capítulo 2. (2003). Nanoparticle and protein corona. En: Protein-nanoparticle interactions. Springer Series in Biophysics 15. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Saha, K., Rahimi, M., Yazdani, M., Tae, S., Moyano, D., Hou, S. et al. (2016). Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. *ACS Nano* 10: 4421-4430.
- Salvati, A., Pitek A, Monopoli M, Prapainop K, Bombelli F. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature nanotechnology* 8: 137-143.
- Sakulkhu, U., Mahmoudi, M., Maurizi, L., Salaklang, J., Hofmann, H. (2014a). Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. *Scientific Reports* 4, 5020.
- Sakulkhu, U., Maurizi, L., Mahmoudi, M., Motazacker, M., Vries, et al. (2014b). Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats. *Nanoscale* 6(19), 11439–50.
- Sée, V., Free, P., Cesbron, Y., Nativo, P., Shaheen, U., Rigden, D. et al. (2009). Cathepsin L Digestion of Nanobioconjugates upon endocytosis. *ACS Nano* 3(9):, 2461–2468.
- Schöttler, Klein, K., Landfester, K., & Mailänder, V. (2016). Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake. *Nanoscale* 14: 5526-36.
- Schroeder, H., Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy clinical immunology* 125: S41-S52.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass specrometry sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical*

chemistry 68:850-858.

- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J., Mann, M. (2006). In gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteoms. *Nature protocols* 1: 2856-2860.
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., Farokhzad, O. C. (2016). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature reviews cancer* 17(1): 20–37.
- Smith, P., Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic. *Analytical Biochemistry* 50: 76-85.
- Skoog, D., West, D., Holler. J. (2001). Fundamentos de química analítica. Cuarta edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.
- Solorio, S. (2013). Desestabilización lisosomal y mitocondrial inducida por la exposición a nanopartículas de Fe₃O₄ y SiO₂ en células A549. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México.
- Stetefeld, J., Mckenna, S. A., Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* 8:409–427.
- Stober, W., Fink, A. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of colloid and interface science* 26: 62–69.
- Strojan, K., Leonardi, A., Bregar, V. B., Krizaj, I., Svete, J., Pavlin, M. (2017). Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *Plos ONE*. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552>
- Sun, L., Li, Y., Liu, X., Jin, M., Zhang, L., Du, Z., Guo, C. (2011). Toxicology in Vitro Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in Vitro* 25(8): 1619–1629. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.06.012>
- Suttiponpanit, K., Jiang, J., Sahu, M., Suvachittanont, S., Charinpanitkul, T., Biswass, P. (2011). Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Research Letters* 6:27.
- Sze, A., Erickson, D., Ren, L., Li, D. (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current – time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science* 261: 402–410.
- Szebeni, J., Muggia, F., Gabizon, A., & Barenholz, Y. (2011). Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(12), 1020–1030.
- Szebeni, J., Bed, P., & Rozsnyay, Z. (2012). Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome *Nanomedicine* 8, 176–184.
- Tiang, L., Cheng, J. (2013). Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. *Nano Today* 8(3): 290–312.

- The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.(2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. Nanoscience and nanotechnologies. Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK.
- Tran, S., Degiovanni, P. J., Piel, B., Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine : a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine* 6:44.
- Ubero, N. (2009). Fundamentos de microscopía electrónica. Técnicas de microscopía aplicadas a las ciencias forenses. Dpto de Zoología y Antropología. Disponible en: http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/Sesion_Teorico-04.pdf. Enero 2018.
- UniProt. The universal protein knowledgebase. Disponible: <http://www.uniprot.org>. Marzo 2017.
- Venditto, V. J., Szoka., F. (2013). Cancer nanomedicines : So many papers and so few drugs ! *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1): 80–88.
- Verderio, P. (2013). Tesis de Doctorado: Synthesis and Biofunctionalization of Novel Composite Nanocarriers for Targeted Detection and Treatment of Malignant Cells Synthesis and Biofunctionalization of Novel Composite Nanocarriers for Targeted Detection and Treatment of Malignant Cells. Universidad de Milano-Bicocca.
- Walkey, C., Chan W. (2012).Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews* 41:2780-2799.
- Weisel, B. J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry*. [http://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)70008-X](http://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)70008-X).
- Wu, Z., Chen H, Liu X, Zhang Y, Li D. et al. (2009). Protein adsorption on poly(N-vinylpyrrolidone)-modified silicon surfaces prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Langmuir* 25:2900-2906.
- Xie, G., Sun J, Zhong G, Shi L, Zhang D. (2010). Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Archives of Toxicology* 84: 183-190.
- Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X. (2010). SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Particle and fibre toxicology* 7:1-
- Zamani, M., Mohammadi, M., Zamani, H., Tavasoli, A. (2016). Pharmacogenetic Study on the Impact of Rivastigmine Concerning Genetic Variants of A2M and IL-6 Genes on Iranian Alzheimer ' s Patients. *Molecular Neurobiology* 53:4521–4528.
- Zanganeh, S., Spittler, R., Erfanzadeh, M., Alkilany, A., Mahmoudi, M. (2016). Protein Corona: Opportunities and Challenges. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.005>.
- Zarschler K, Prapainop K, Mahon E, Rocks L, Bramini M, et al. (2014). Diagnostic nanoparticle targeting of the EGF-receptor in complex biological conditions using single-domain antibodies. *Nanoscale* 6: 6046-6056.

8 APÉNDICE

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

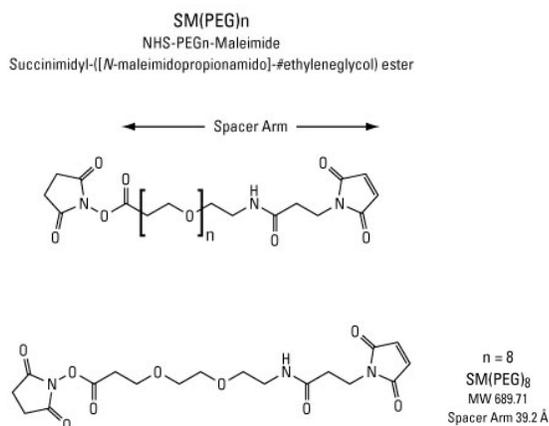
DESCRIPCIÓN DE REACTIVOS PARA LA SÍNTESIS DE NP

Reactivo SM(PEG)₈. Es un “crosslinker” heterobifuncionales que contienen un grupo éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y un grupo maleimido que permite la conjugación covalente de moléculas que posean grupos aminos y sulfhidrilo, respectivamente. Además, contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) que mejoran la solubilidad de conjugados, reduce el potencial de agregación e incrementa la flexibilidad de las moléculas ancladas. El grupo NHS reacciona con aminos primarias a pH de 7 a 9 mientras que el grupo maleimido reacciona con los grupos sulfhidrilos a pH de 6.5 a 7.5 para formar enlaces tioéster estables.

Características:

De Thermo Fisher Scientific Pierce

- Fórmula molecular: C₃₀H₄₇N₃O₁₅
- Peso molecular: 689.71 g/mol
- “Spacer arm length”: 39.2 Å
- Líquido viscoso



Preparación del reactivo:

- Los reactivos SM(PEG)_n son líquidos viscosos que son difíciles de pesar o dispensar. Para facilitar su manejo se realiza una solución stock inmediatamente antes de su primer uso, disolviendo el “crosslinker” en un solvente orgánico libre de agua (como dimetilsulfóxido). Debe minimizarse la exposición a la humedad ya que el grupo éster es susceptible a hidrólisis. Posteriormente, la solución stock debe guardarse en condiciones libres de humedad (bajo gas inerte como argón o nitrógeno) a -20°C.
- El vial con el reactivo debe atemperarse a temperatura ambiente antes de abrirse para evitar condensación en el interior del vial, así como tomar alícuotas con una jeringa. Estabilidad por tres meses.
Por 100 mg del reactivo, se añade 480 µl de DMSO
- Deben evitarse amortiguadores que contengan grupos amino (ej. tris o glicina) o sulfhidrilo ya que pueden competir en la reacción de interés. Si es necesario las muestras son dializadas o purificadas en un amortiguador apropiado como PBS pH de 6.5-7.5 con EDTA 1-5 mM para prevenir la formación de puentes disulfuros catalizados por metales.

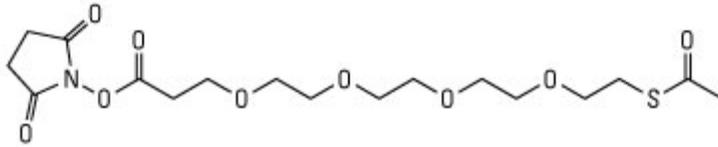
Reactivo SAT(PEG)₄

El reactivo N-succinimidil S-acetil(tiotetraetileneglicol) es utilizado en métodos de bioconjugación para incorporar grupos sulfhidrilo (-SH) en proteínas en donde estos grupos no están disponibles o ausentes, en donde el grupo S-acetil (SAT) previene la oxidación del átomo de sulfuro y es fácilmente removido a través del tratamiento con hidroxilamina cuando el grupo sulfhidrilo es necesario para la conjugación y por último el PEG minimiza el impedimento estérico y provee solubilidad a las moléculas conjugadas.

Características:

De Thermo Fisher Scientific Pierce (#26099)

- Fórmula molecular:
- Peso molecular: 421.46
- “Spacer arm length”: 18.3 Å
- Líquido muy viscoso



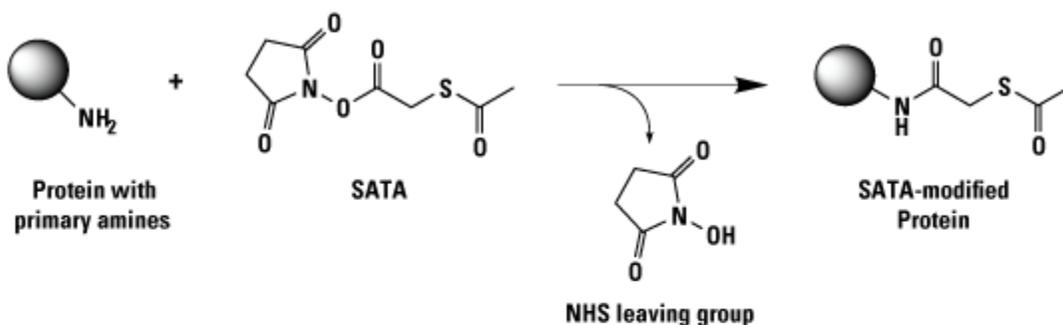
SAT(PEG)₄

MW 421.46

A través de su grupo éster NHS puede reaccionar con aminas primarias (ej. residuos de lisina) de manera específica y espontánea en amortiguadores de fosfato a pH de 7-9, dando como resultado enlaces amida estables y covalentes. Como se mencionó anteriormente, se procede desproteger el grupo sulfhidrilo con hidroxilamina.HCl y éste grupo puede reaccionar con el “crosslinker” SM(PEG)₈.

Reacciones:

Modification of protein amines with S-acetyl (SAT) Reagent:



Deprotection of sulfhydryl group by treatment with hydroxylamine:

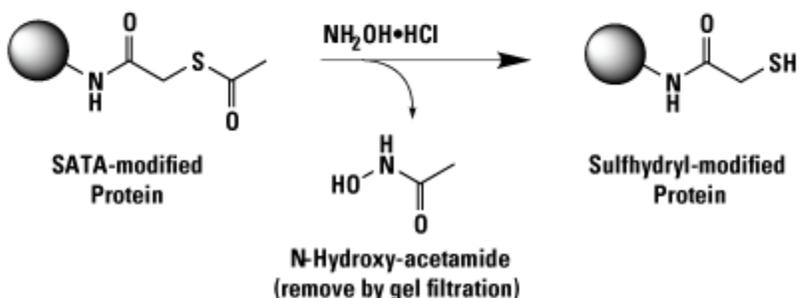


Figura 2. Esquema de reacción y modificación de reactivos S-acetil(SAT).

Preparación del reactivo:

- Los reactivos SM(PEG)_n son líquidos viscosos que son difíciles de pesar o dispensar. Para facilitar su manejo se realiza una solución stock inmediatamente antes de su primer uso, disolviendo el “crosslinker” en un solvente orgánico libre de agua (como dimetilsulfóxido). Debe minimizarse la exposición a la humedad ya que el grupo éster es susceptible a hidrólisis. Posteriormente, la solución stock debe guardarse en condiciones libres de humedad (bajo gas inerte como argón o nitrógeno) a -20°C.

Se prepara una solución stock de 250 mM, disolviendo 100 mg de SAT(PEG)₄ en 850 µl.

- El vial con el reactivo debe atemperarse a temperatura antes de abrirse para evitar condensación en el interior del vial, así como tomar alícuotas con una jeringa. Con un adecuado manejo la solución es estable por tres meses.

La solución de desacetilación se prepara disolviendo 1.74 g de hidroxilamina.HCl y EDTA (0.475 g tetrasódico ó 0.365 g disódico) en 40 ml del amortiguador. Añadir agua ultrapura a un volumen final de 50 ml y ajustar el pH de 7.2-7.5 con NaOH

Transferrina Sigma-Aldrich #T4132

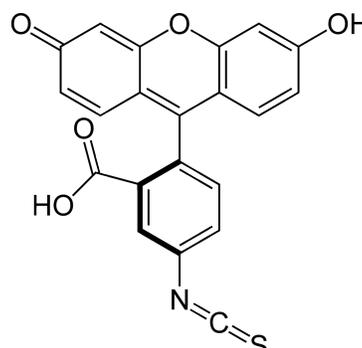
Características:

- Masa molecular 76-81 kDa
- Pureza >98%
- $\lambda_{\text{máx}}$ 280 nm (agua)
- Holoenzima (Contenido de Fe: 1100-1600 ppm, 1,100-1,600 $\mu\text{g/g}$)
- Solubilidad 50 mg/ml H_2O
- Agua $\leq 10\%$
- Origen: humano
- Almacenar: 2-8°C
- Polvo liofilizado
- Color en solución: Rojo, rojo-naranja. No turbia.
- Solubilidad en agua (50 mg/ml)
- Las soluciones acuosas permanecen activas a 4°C de 5 a 10 días y deberán ser filtradas-esterilizadas para su máxima estabilidad.

FITC (Isómero I) Sigma-Aldrich # F7250

Características:

- Polvo
- Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$
- Peso molecular: 389.4



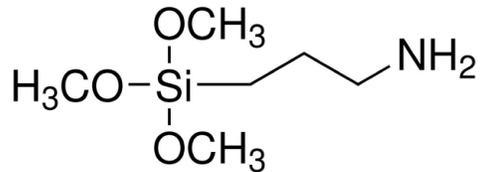
- Longitud de excitación: 495 nm
- Longitud de emisión: 525 nm
- Solubilidad 1 mg/ml en acetone
- Soluble en DMSO a 5 mg/ml
- Soluble en agua menos de 0.1 mg/ml
- Soluble en etanol a 20 mg/ml
- Soluble en 2-metoxietanol 9 mg/ml
- Se utiliza un solvente orgánico debido a que se descompone en agua.
- Almacenaje 2-8°C

El isocianato de fluoresceína se utiliza para marcar proteínas a través de los grupos amino terminales y de aminas primarias al reaccionar éstos con el isocianato.

APTMS (3-aminopropil)trimetoxisilano Sigma-Aldrich # 281778

Características:

- Líquido
- Densidad: 1.027 g/ml a 25°C.
- Fórmula molecular: C₆H₁₇NO₃Si
- Peso molecular: 179.28958
- Almacenar en temperatura ambiente



HEPES: Es un amortiguador orgánico zwitteriónico, estable, soluble en agua y no reacciona con cationes divalentes y amortigua en rangos de 6.8-8.2.

Características:

- Peso molecular: 238.3
- pKa de 7.5 a 37°C

9 ANEXOS

- **Artículo científico producto de esta tesis:**

Solorio-Rodríguez, A., Escamilla-Rivera, V., Uribe-Ramírez, M., Chagolla, A., Winkler, R., García-Cuellar, C.M., De Vizcaya-Ruiz, A. (2017). A comparison of the human and mouse protein corona profiles of functionalized SiO₂ nanocarriers. *Nanosclae* 9:13651-13660.



Cite this: *Nanoscale*, 2017, 9, 13651

A comparison of the human and mouse protein corona profiles of functionalized SiO₂ nanocarriers†

A. Solorio-Rodríguez,^a V. Escamilla-Rivera,[‡] M. Uribe-Ramírez,^a A. Chagolla,^b R. Winkler,^b C. M. García-Cuellar,^{*,c} and A. De Vizcaya-Ruiz^{*,a}

Nanoparticles are a promising cancer therapy for their use as drug carriers given their versatile functionalization with polyethylene glycol and proteins that can be recognized by overexpressed receptors in tumor cells. However, it has been suggested that in biological fluids, proteins cover nanoparticles, which gives the proteins a biological identity that could be responsible for unexpected biological responses: the so-called protein corona. A relevant biological event that is usually ignored in protein-corona formation is the interspecies differences in protein binding, which can be involved in the discrepancies observed in preclinical studies and the nanoparticle safety and efficiency. Hence, the aim of this study was to determine the differences between human and mouse plasma protein corona profiles in an active therapy model using silicon dioxide nanoparticles (SiO₂ nanoparticles) functionalized with polyethylene glycol and transferrin. Functionalized SiO₂ nanoparticles were made with a primary particle size of 25 nm and a transferrin content of 50 μg mg⁻¹ of nanoparticles and were PEGylated with a cross-linker. The proteomic analysis by nanoliquid chromatography tandem-mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) showed interspecies differences. The most abundant proteins found in the human protein corona profile were immunoglobulins, actin cytoplasmic 1, hemoglobin subunit beta, serotransferrin, ficolin-3, complement C3, and apolipoprotein A-1. Meanwhile, the mouse protein corona adsorbed the serine protease inhibitor A3K, serotransferrin, alpha-1-antitrypsin 1–2, hemoglobin subunit beta, and fibrinogen gamma and beta chains. These protein-corona profile differences in the functionalized SiO₂ nanoparticles indicate that biological responses observed in *in vivo* models could not be translated to clinical use and must be considered in the interpretation of preclinical trials in order to design more efficient and safer nanomedicines.

Received 29th June 2017,
Accepted 19th July 2017
DOI: 10.1039/c7nr04685e
rsc.li/nanoscale

Introduction

Nanoparticles (NPs) are of interest for their potential use as drug carriers in several fields, especially the medical field. It has been proposed that their use in cancer therapy will provide advantages such as longer circulation lifetimes, controlled drug release, increased solubility, selective accumulation in tumor sites, reduced drug concentrations in healthy tissues, and minimal chemotherapy side effects.¹ To achieve

these goals, two strategies have been developed: passive therapy and active therapy. Passive therapy is based on NP accumulation in a tumor site by enhanced permeability and retention. On the other hand, active therapy promises to be more specific as it is based on the attachment of targeting molecules that can be recognized by overexpressed receptors in cancer cells to the NP surface.² Despite the increasing development of NPs for medical purposes, these objectives have not been entirely reached, which is reflected in the fact that the number of commercial NPs is lower than the number of investigational NPs and that NPs registered for clinical trials represent only 2% of investigational NPs.³ Moreover, nanomedicine treatments present adverse effects similar to those of the free drugs administered, and the costs are higher than those of traditional medicine as it is in fenofibrate and amphotericin B NP formulations.⁴ Nanomedicine products are mainly administered intravenously. Once in the blood circulation, NPs adsorb proteins,⁵ forming a protein corona (PC) on the NP surfaces,⁶ which creates a “biological identity” that

^aDepartamento de Toxicología. Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco, Mexico DF, Mexico. E-mail: avizcaya@cinvestav.mx; Tel: +52 55 5747-3800 ext 5420

^bDepartamento de Biotecnología y Bioquímica. Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato, Irapuato, Mexico

^cInstituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, Mexico DF, Mexico. E-mail: cgarciac@salud.gob.mx; Tel: +52 55 5628 0400 ext 34021

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7nr04685e

‡Current address: Instituto Politécnico Nacional. CIEMAD.

could drive biological responses.⁷ The limited understanding of the PC identity has been proposed as the gap between development and clinical application;⁸ therefore, understanding the PC is crucial to filling this gap. The study of PC formation has mainly focused on the physicochemical properties of NPs and biological compartments, including personalized PCs and PCs in different culture media.^{9,10} Nevertheless, there is a lack of information about interspecies differences that could be helpful in understanding the differences between preclinical and clinical trial responses. As such, the aim of this study was to determine whether there are any differences between a human protein corona (HPC) and a mouse protein corona (MPC) in an active therapy model of functionalized SiO₂ NPs with polyethylene glycol (PEG) and transferrin (Tf). SiO₂ NPs are considered biocompatible and useful for bioconjugation in active targeting.¹¹ In addition, PEG is considered the gold standard coating for NPs,¹² and Tf is used as an anchored ligand that is recognized by Tf receptors in cancer cells.^{3,13,14} This study identified interspecies differences between the HPC and the MPC of functionalized SiO₂ NPs in the proteins implicated in the immune response, coagulation, metabolism, and transport. Our results suggest that these differences and human plasma characterization should be considered to support the findings of preclinical studies in order to achieve successful clinical trials.

Materials and methods

Holo-transferrin human (T4132), fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC, F7250), (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS, 281778), tetraethyl orthosilicate (TEOS, 86578), ethanol (459828), ammonium hydroxide (NH₄OH, 338818), dimethyl sulfoxide anhydrous (DMSO, 276855), ethanol anhydrous (676829), and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl, C4706) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). PEGylated SMCC cross-linker (SM[PEG]₈, 22108), PEGylated *N*-succinimidyl *S*-acetylthioacetate (SAT[PEG]₄, 26099), hydroxylamine-HCl (26103), bovine serum albumin standard ampules (BSA, 23209), ultrapure ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dehydrate (EDTA, 15576028), NuPAGE 4–12% bis-tris Protein gels (NP0335BOX), bicinchoninic-acid protein assay reagent A (23223), and NuPAGE LDS sample buffer (NP0007) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). A desalting Sephadex G-25 column (52130800) was purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Synthesis of NPs

Synthesis was performed to obtain functionalized SiO₂ NPs.^{13,15} The process was based on the Stöber method, which consists of the hydrolysis of alkyl silicates and their condensation in alcoholic solutions using ammonia as a catalyst to obtain monodisperse silica nanoparticles.¹⁶ Subsequently, hydroxyl groups were replaced by amine groups using alkoxy-silanes, which react with the surface silanol groups. Once NP surfaces are aminated, they react with PEG cross-linker spacers

that contain an *N*-hydroxysuccinimide ester and a maleimide group. The primary amines on NP surfaces react with an *N*-hydroxysuccinimide ester at pH 7 to 9 to form amide bonds, and the maleimide group reacts with the sulfhydryl groups of the protein at pH 6.5 to 7.5. The sulfhydryl group in Tf is given by its bioconjugation with SAT(PEG)₄ (Fig. 1).¹³

Synthesis and functionalization of SiO₂ NPs. The FITC-APTMS solution was prepared by dissolving 4 mg of FITC in 2 ml of ethanol and 20 μl of APTMS. The reaction proceeded for 4 h in darkness. Twenty-five milliliters of ethanol, 1 ml of NH₄OH, and 500 μl of a FITC-APTMS were mixed, and the solution was stirred for 15 min. Subsequently, 940 μl of TEOS were added dropwise under stirring, and after 20 h in darkness, the NPs were washed 3 times with ethanol and 3 times with water by centrifugation–resuspension at 20 817g for 25 min. The NPs were resuspended in 12 ml of water. Acid acetic/APTMS (0.05%/0.1%) was added to 10 mg ml⁻¹ of NPs, and the solution was sonicated for 1 min. The NPs were stirred for 2 h and then incubated at 90 °C for 1 h. The NPs were washed 3 times with ethanol and 2 times with water, and the amination process was corroborated by the change from an acidic to a basic isoelectric point (IEP). After 12 h, the aminated NPs were washed 2 times with HEPES, and then, SMPEG₈ was added to the solution dropwise at 5 mg ml⁻¹. The reaction was incubated at room temperature for 2 h with sonication. The NPs were washed 2 times with HEPES and resuspended at 10 mg ml⁻¹ in HEPES deoxygenated at pH 7.4. Simultaneously, 5 mg of Tf was dissolved in 1 ml of degassed PBS (by freeze–pump–thaw cycling) at pH 7.4 with 0.046 μmoles of SATPEG₄. After 30 min, 100 μl of deacetylation buffer was added, and the reaction proceeded for 2 h. The solution was passed through a Sephadex G25 column with deoxygenated HEPES and then incubated with 1 mM TCEP for 5 min. PEG₈-NP and PEG₄-Tf were combined and incubated for 2 h under an inert atmosphere of nitrogen.¹³ Then, the NPs were incubated at 4 °C overnight. Finally, the NPs were washed 3 times with a phosphate buffered saline solution, pH 7.4, and resuspended at a final concentration of 10 mg ml⁻¹.¹⁵

Transmission electron microscopy (TEM) of SiO₂ NPs

To characterize the primary size of the SiO₂ NPs, a 10 μl aliquot of the NP solution was deposited on a Lacey Formvar/carbon grid. The NPs were observed on a JEM-ARM200F at an

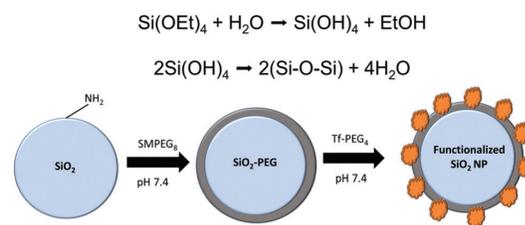


Fig. 1 Scheme representing the synthesis and functionalization of an SiO₂ NP.

accelerating voltage of 120 kV. At least 100 NPs were counted to determine the size distribution using Gatan Digital Micrograph Software.

Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy of SiO₂ NPs

The SiO₂ NPs were deposited onto carbon surfaces. Scanning electron microscopy characterization was performed to obtain the morphology of the NPs, and the composition of the NPs was determined by energy dispersive spectroscopy analysis on an AURIGA 3916-FESEM microscope operating at an accelerating voltage of 120 kV with a 120 eV resolution.

Dynamic light scattering and laser Doppler electrophoresis of NP dispersions

Dynamic light scattering is a technique that analyzes the velocity of particle movement by measuring fluctuations in the light scattering intensity caused by Brownian motion. The hydrodynamic diameter (D_H) is calculated through the Stokes-Einstein equation, and the polydispersity index (PDI), which represents the broadness of the size distribution in the solution, is calculated from the cumulative analysis. Laser Doppler electrophoresis applies an electric field to the NP suspension, and when a laser passes through the sample, the light scatters with a frequency dependent on the particle movement. With this frequency and the Smoluchowski equation, the electrophoretic mobility and the zeta potential (ζ) can be determined.¹⁷ Both techniques were performed on a Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS90 instrument. The samples, functionalized SiO₂ NPs in PBS and PC functionalized SiO₂ NPs at 1 mg ml⁻¹, were analyzed in triplicate.

Thermogravimetric analysis

The SiO₂ NPs and the functionalized SiO₂ NPs were dried at room temperature, and the sample used was at least 1 mg. The temperature ranged from 30 °C to 500 °C under a nitrogen atmosphere, and the temperature was changed by 10 °C per minute. The analysis was performed in an SDT Q600 V20.9.

Bicinchoninic acid assay

The Tf protein content in the functionalized SiO₂ NPs was quantified using a bicinchoninic acid (BCA) assay. Bovine serum albumin was used as a standard, and 0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg ml⁻¹ were prepared to generate a calibration curve. Ten microliters of each standard and 10 μ l of each sample were placed in a 96-well plate. Then, 100 μ l of BCA/CuSO₄ was added to each well, and the plates were incubated at 60 °C for 30 min. The absorbance was measured at 532 nm. BCA/CuSO₄ was prepared at a 1 : 50 ratio. The samples' absorbance of PEG NPs was subtracted from the absorbance of the functionalized SiO₂ NPs.^{13,15} The samples were run in duplicate in 3 independent experiments.

Endotoxin level by limulus amoebocyte lysate assay

Endotoxin is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and is a ubiquitous contaminant. This mole-

cule can be adsorbed onto NP surfaces during their synthesis, and the presence of this molecule can stimulate inflammation.¹⁸ Therefore, the endotoxin level needs to be evaluated in nanomedicines. The limulus amoebocyte lysate assay, a test approved by the FDA, is based on the activation of the proteolytic activity Factor C in the presence of endotoxins. The activated protease catalyzes the cleavage of the chromogenic substrate *p*-nitroaniline, resulting in a yellow suspension that is quantified by measuring the absorbance at 405 nm. A QCL-1000 TM Endpoint Chromogenic kit from Lonza was used according to the manufacturer's instructions to determine the endotoxin level. The dispersions of the functionalized SiO₂ NPs were prepared at 0.5 mg ml⁻¹ in MilliQ water in sterile plastic tubes, and the samples were run in triplicate in sterile PBS.

Human plasma

Human plasma (HP) was collected from 30 healthy volunteers, and EDTA was used as an anticoagulant. The samples were de-identified and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. The sample volumes were combined into one container, and the aliquots were stored at -80 °C. Whole blood was taken from healthy donors by venipuncture and prepared according to the institutional bioethics code. Informed consent was obtained from each participant prior to inclusion in accordance with the Declaration of Helsinki.

Mouse plasma

Mouse plasma (MP) was obtained from 12 male BALB/cJ mice by cardiac puncture, with EDTA as an anticoagulant. The samples were centrifuged at 3000 rpm at 4 °C for 10 min, and they were pooled, aliquoted, and stored at -80 °C. All animal experimental procedures were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio, CICUAL) from Cinvestav-IPN.

Protein corona formation in the HP and MP of functionalized SiO₂ NPs

The functionalized SiO₂ NPs were incubated with approximately 55% HP or MP at 1.5 mg ml⁻¹ NPs for 30 min at 37 °C. The protein was quantified in the HP and the MP by the Bradford method to incubate NPs with the same protein quantity. After 3 washes with PBS-EDTA by centrifugation and resuspension, the PC was resolved by gel electrophoresis using a 4% to 12% polyacrylamide gel, and stained with colloidal coomassie blue G-250. A densitometry analysis was performed by ImageJ, and the samples were analyzed by LC-MS/MS.¹⁹ The molecular weight and the IEP were obtained from UniProt, the universal protein knowledgebase,²⁰ and the ExpASY Bioinformatics Resource Portal.²¹

Determination of protein corona profiles by nanoLC-MS/MS

One-dimensional SDS-PAGE bands were cut into fractions and prepared for analysis by reduction, alkylation, and tryptic digestion.^{22,23} The peptide extracts were analyzed on a nano-liquid chromatography system (Acquity UPLC, Waters) and

coupled by an electrospray ionization interface to a linear ion trap mass analyzer (LTQ Velos, Thermo). The ProteoWizard tool msconvert was used to convert raw mass spectra to the HUPO mzML file format.²⁴ A protein search was performed using the UniProt fasta database for *Homo sapiens* and *Mus musculus*, employing a target-decoy strategy.²⁵ To obtain the relative protein abundance of every protein identified by nanoLC-MS/MS, we employed a label-free quantification strategy with a normalized spectral abundance factor approach ($q < 0.01$). Proteomics data analyses were performed using the Crux mass spectrometry analysis toolkit²⁶ on an in-house computer cluster ('LAICBIO,' CINVESTAV Irapuato, Mexico). The raw mass spectrometry data, the converted files, the databases, the scripts used for data processing, and the results in plain-text format were deposited in Zenodo (<https://zenodo.org/>; DOI: 10.5281/zenodo.807702).

Analysis of protein corona profiles using ClueGO

ClueGO, a Cytoscape application, was employed to analyze and visualize the network of biological processes related to the HPC and the MPC. The data were analyzed using a hypergeometric test and *P*-value correction with a Bonferroni step down. Global *Homo sapiens* and *Mus musculus* were used for gene ontology (GO) analysis. The GO terms were visualized as nodes linked based on their kappa score levels of 0.5.

Statistical analysis

The data analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). The data are presented as the mean \pm standard deviation of at least 3 independent experiments.

Results and discussion

Nanomedicine is focused on NPs as drug carriers in order to overcome the challenges of anticancer treatment in traditional medicine. Active therapy seems to achieve this goal, and inorganic NPs are gaining popularity due to their easy surface modification. Active therapy is based on the "synthetic identity", not the "biological identity", which has been suggested to be responsible for the biological effects.⁷ Thus, understanding PC formation can be crucial for the development of successful commercial NP treatments. The influence of the physicochemical properties of NPs and biological fluids on the PC is being extensively studied and described.^{27–31} However, few studies about the protein source have been reported. For example, polyacrylic acid-cobalt ferrite NPs (PAA NPs) and silica NPs show different PC profiles when they are dispersed in different media, such as PBS, NaCl, and RPMI.¹⁰ Moreover, cell culture media, DMEM or RPMI, determine the composition of PC on citrate-capped gold NPs.³² In addition, the use of serum or plasma, as well as different anticoagulants, influences the formation of the PC and the cellular uptake of silica NPs.^{30,33} As the protein source can determine PC formation, the concept of a "personalized protein corona" has emerged.³⁴ It was demonstrated that sulfonated polystyrene NPs and silica NPs incubated with plasma from patients with different diseases, such as cancer, diabetes, and hypercholesterolemia, among others, showed different PC profiles.³⁴ Additionally, PCs formed in plasma from patients with different types of cancer are different.³⁵ Furthermore, the PC of graphene oxide sheets formed in the plasma of patients with various conditions showed different cellular responses in MCF-7 and

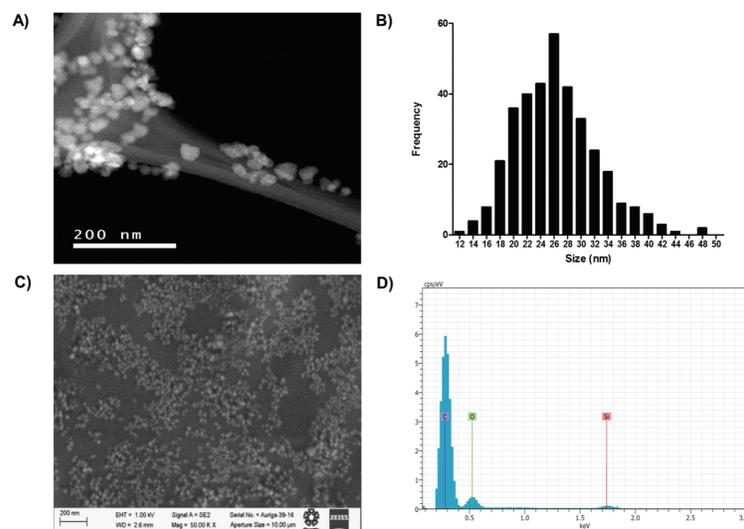


Fig. 2 Physicochemical characterization of SiO₂ NPs. The primary size was determined by (A) a TEM image, (B) the frequency of the size distribution of NPs, (C) an SEM image, and (D) the elemental composition, which was determined by an energy dispersive X-ray spectroscopy analysis. Scale bar: 200 nm.

MDA-MB-231 cells related to ROS, MDA, and NO production.³⁶ Interestingly, the concept of a personalized PC now takes into consideration the gender, smoking, diet, age and geographical origin.⁹ Despite the differences described in the PC profiles from serum fetal bovine (thrombin, hemoglobin, and alpha-1-antitrypsin) and human plasma (vitronectin, clusterin, and fibrinogen),³⁰ the interspecies differences described in the literature focus on the immune response³⁷ and drug plasma protein binding.³⁸ However, more information on the influence of interspecies PC differences on the effectiveness of the NP functionality and even NP toxicity is needed because there is a lack of information about the interspecies differences between the PC profiles of humans and those of other species (*i.e.*, mouse). This information would be useful for the interpretation of preclinical and clinical studies identifying what responses observed in *in vivo* models could be translated to clinical trials in active therapy. The experimental model performed in this study consisted of SiO₂ NPs bioconjugated with PEG and Tf. This is an excellent model for active therapy because it entails three important elements: an inorganic core, the gold standard polymer for coating, and a protein that is recognized by a receptor overexpressed in cancer cells.¹⁴ Our results showed SiO₂ NPs synthesized with a primary size of 25 nm and a spherical morphology without impurities (Fig. 2). After the functionalization process, the presence of organic compounds (PEG and Tf) was corroborated by a thermogravimetric analysis. Functionalized SiO₂ NPs showed a loss of mass (26.31%, 9.31%) at 289 °C and 414 °C, which was not

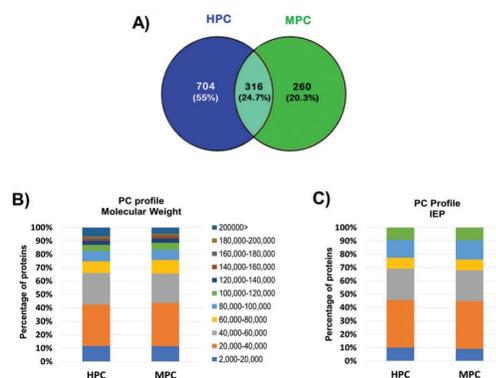


Fig. 4 Characteristics of proteins implicated in the PC profiles of functionalized SiO₂ NPs. Proteins in the HPC and MPC profiles were identified and classified according to their physicochemical properties: (A) number of proteins identified by LC-MS/MS, (B) molecular weight, and (C) IEP of proteins in the HPC and the MPC.

observed in SiO₂ NPs (ESI Fig. 1†). At these temperatures (200 °C to 400 °C), the degradation of organic compounds has been reported.³⁹ These results indicate the presence of PEG and Tf in the functionalized SiO₂ NPs. Additionally, the PEGylation of the functionalized SiO₂ NPs was evident because the functionalized SiO₂ NPs adsorbed less protein than SiO₂ NPs (ESI Fig. 2†), as was reported for PEGylation in previous

Table 1 Characterization of functionalized SiO₂ NP dispersion

PBS ^a			PC ^b			Endotoxin level EU mL ⁻¹	Transferrin content μg mg ⁻¹ NP
D _H (nm)	PDI	ζ (mV)	D _H (nm)	PDI	ζ (mV)		
207.3 ± 2.9	0.253 ± 0.018	-19.5 ± 0.5	183.8 ± 8.22	0.366 ± 0.04	-18.2 ± 1.69	<0.04	57.48 ± 6.83

^a Functionalized SiO₂ NPs dispersed in PBS. ^b PC formed around functionalized SiO₂ NPs. Values represent mean ± standard deviation.

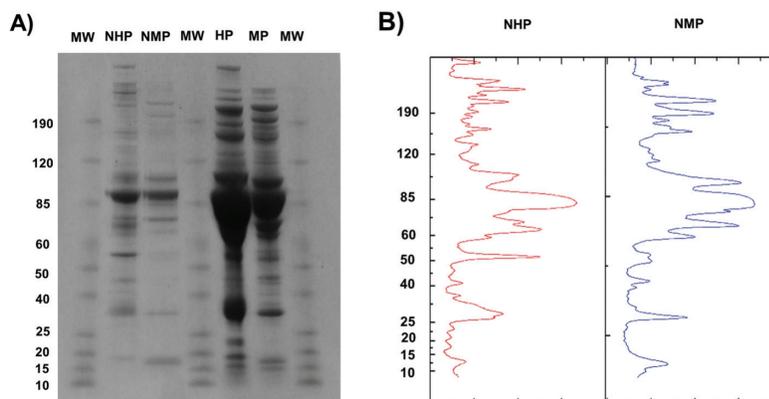


Fig. 3 Interspecies differences around functionalized SiO₂ NPs by gel electrophoresis. NPs were incubated with HP and MP at 1.5 mg mL⁻¹ for 30 min at 37 °C. The PC was resolved by (A) gel electrophoresis and (B) a densitometry analysis using ImageJ. MW: Molecular Weight. NHP: PC from nanoparticles incubated with HP, and NMP: PC from nanoparticles incubated with MP.

studies.⁴⁰ The dispersion of the functionalized SiO₂ NPs with and without a PC was characterized. Functionalized NPs without a PC showed a hydrodynamic diameter of 207.3 nm, a polydispersity index of 0.253, and a ζ of -19.5 mV. Meanwhile, the functionalized NPs with a PC showed a hydrodynamic diameter of 183.8 nm, a polydispersity index of 0.336, and a ζ of -18.2 mV. Finally, the amount of Tf in the functionalized SiO₂ NPs was 57.48 μg per mg of NP, determined by the BCA assay, and the endotoxin level was <0.04 EU ml⁻¹ (Table 1), a value that is below the FDA limits for medical devices (0.5 EU ml⁻¹).⁴¹

To identify the interspecies differences, the PCs of the functionalized SiO₂ NPs were formed in HP and MP and were analyzed by gel electrophoresis and nanoLC-MS/MS. A densitometry analysis showed differences in the HPC and the MPC, with a greater extent of proteins adsorbed from the HP (Fig. 3). The PC profile was determined by nanoLC-MS/MS, and proteins in every sample were semi-quantified using a label-free quantitation method to obtain the relative protein abundance. A proteomic analysis showed 704 unique proteins in the HPC, 260 unique proteins in the MPC, and 316 common proteins in

Table 2 List of common proteins identified in the HPC and MPC profiles of functionalized SiO₂ NPs

Protein names	Function
Alpha-1-acid glycoprotein 1	Transports proteins and drugs in the bloodstream, and modulates the activity of the immune system during the acute-phase reaction.
Alpha-2-antiplasmin	Inhibits plasmin and trypsin that regulates the blood coagulation cascade
Alpha-2-HS-glycoprotein	Promotes endocytosis as opsonin and shows affinity for calcium and barium ions
Angiotensinogen	Component of the renin-angiotensin system (RAS), regulates blood pressure, body fluid and electrolyte homeostasis
Antithrombin-III	Serine protease inhibitor that regulates the blood coagulation cascade
Apolipoprotein A-I, A-II, A-IV, B-100, C-I, C-III, C-IV, D, E	Transport lipids, lipid metabolism
Beta-2-microglobulin	Component of the class I major histocompatibility complex (MHC) that is involved in peptide antigens presentation
Carboxypeptidase	Enzyme that hydrolyzes the terminal amino acid of a polypeptide protein from the end that contains a free carboxyl group
CD5 antigen-like	Regulates lipid synthesis. It is expressed by macrophages and regulates the mechanism in inflammatory responses
Ceruloplasmin	It has ferroxidase activity oxidizing and it is involved in iron transport across the cell membrane
Coagulation factor V, VII, X, XI, XII, XIII A chain, XIII B chain	Regulates blood coagulation
Complement C1q, C2, C3, C4-B, C5, C8, C9	Complement activation
Complement factor B, H, I	Complement activation
Fibrinogen alpha, beta, gamma chain	It is cleaved by protease thrombin to yield monomers which polymerize to form an insoluble fibrin matrix
Fibulin-1	Cell adhesion and migration along protein fibers within the extracellular matrix
Gelsolin	Promotes the assembly of monomers into filaments
Glutathione peroxidase 3	Protects cell and enzymes from oxidative damage
Haptoglobin	Captures and combines with free plasma hemoglobin to allow hepatic recycling of heme iron to prevent kidney damage
Hemoglobin	Oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues
Hemopexin	Binds and transports heme to the liver for breakdown and iron recovery
Histidine-rich glycoprotein	It is an adapter protein that regulates immune complex and pathogen clearance, cell chemotaxis, cell adhesion, angiogenesis and coagulation
Immunoglobulin	Elimination of bound antigens in the phase of humoral immunity
Inter-alpha-trypsin inhibitor, H1 H2	Acts as a carrier of hyaluronan in serum or as a binding protein between hyaluronan and other matrix proteins
Isocitrate dehydrogenase	Enzyme that catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate producing alpha-ketoglutarate
Kininogen-1	Acts as an inhibitor of thiol proteases
L-Lactate dehydrogenase A chain	Enzymes that catalyze lactate producing pyruvate
Mannan-binding lectin serine protease	Recognizes pathogens through patterns of sugar moieties in the lectin pathway of complement
Metalloproteinase inhibitor 3	Inactivates metalloproteinases by binding to their catalytic zinc cofactor
N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Plays a scavenger role by digesting biologically active peptidoglycan into biologically inactive fragments
Plasma Kallikrein	Enzyme that cleaves Lys-Arg and Arg-Ser bonds. Plays a role in the renin-angiotensin system
Plasminogen	Dissolves the fibrin of blood clots and acts as a proteolytic factor in embryonic development, tissue remodeling and inflammation
Platelet factor 4	Released during platelet aggregation. Chemotactic of neutrophils and monocytes. Inhibits endothelial cell proliferation
Retinol-binding protein 4	Delivers retinol from the liver stores to the peripheral tissues
Serum albumin	The main protein of plasma that binds calcium, sodium, potassium, fatty acids, hormones, bilirubin and drugs
Vitronectin	It is a cell adhesion and spreading factor
Von Willebrand factor	Promotes the adhesion of platelets to the sites of vascular injury
Zinc-alpha-2-glycoprotein	Stimulates lipid degradation in adipocytes

Source: UniProt: the universal protein knowledgebase.

the HPC and the MPC (Fig. 4). Regarding the physicochemical properties of proteins adsorbed on the functionalized SiO₂ NP surfaces, the same profile was observed in both matrices. Proteins with molecular weights from 20 to 60 kDa and IEPs from 5 to 7 were abundant in the HPC and the MPC (Fig. 4). It has been suggested that the interaction of NPs with proteins could mediate cellular interactions and biological responses.⁴² Additionally, proteins adsorbed on NP surfaces can go through conformational changes, leading to altered functions, protein unfolding,⁴³ protein aggregation,⁴⁴ and new epitope exposure.^{45,46} Therefore, PC profiles provide insight into the biological process that could be activated by exposure to NPs. In general, PC profiles consist of albumin, apolipoproteins, coagulation factors, complements, immunoglobulins, fibrinogen, and others (Table 2). To associate the adsorbed proteins with biological processes, the PC profiles of the functionalized SiO₂ NPs were analyzed using gene ontology. The HPC and MPC profiles are related to proteins involved in complement activation, integrin-mediated signaling pathways, actin cytoskeleton organization and regulation, transport, the purine ribonucleoside triphosphate metabolic process, and blood circulation regulation. The HPC profile was related to proteins from the Fc receptor signaling pathway, natural killer cell mediation, peptidase activity regulation, endothelial barrier establishment, and negative regulation of programmed cell death (ESI Fig. 3†). Meanwhile, the MPC showed proteins implicated in plasma lipoprotein particle remodeling, responses to organic substances, morphogenesis, and reactive metabolic oxygen species (ESI Fig. 4†). Proteins that are part of the “adsorbome”⁷ represent the most abundant proteins in the HPC and MPC profiles of the functionalized SiO₂ NPs. However, in the comparison of the first 25 proteins, each protein was present in different relative abundances between the HPC and the MPC (Fig. 5). Albumin was the most abundant protein found in both matrices (approximately 10%), but

the HPC preferably adsorbed immunoglobulins (7%), actin cytoplasmic 1 (3.46%), hemoglobin subunit beta (1.56%), serotransferrin (1.44%), ficolin-3 (1.38%), complement C3 (1.30%), and apolipoprotein A-1 (1.29%). Meanwhile, the MPC adsorbed serine protease inhibitor A3K (5.88%), serotransferrin (5.29%), alpha-1-antitrypsin 1–2 (3.55%), hemoglobin subunit beta (3%), fibrinogen gamma chain (2.65%), and fibrinogen beta chain (2.56%). These results indicate that immunoglobulins predominate in the HPC; meanwhile, other proteins, such as fibrinogen and serotransferrin, are adsorbed on NP surfaces from MP to a greater extent. These evident differences suggest that the biological responses observed in mouse models could not be the same as those expected in clinical use. For example, immunoglobulins and complements are adsorbed on NP surfaces more from HP than from MP. Thus, the immune response has more opportunities to be activated in human blood. Interestingly, there are proteins—ficolin-3, alpha-2-macroglobulin, talin-1, Ras-related protein Rap-1A, myosin 9, and apolipoprotein B—that are only present in high proportions in the HPC profile. This result suggests that the biological responses, such as immune responses, related to these proteins could not be observed in animal models to the same extent. In the absence of these responses in animal models, the next phase for NPs is clinical use, but they are withdrawn due to anaphylaxis, allergy, and hypersensitivity (*i.e.*, poor efficacy or biocompatibility was observed in treatments).⁴⁷ On the other hand, the adsorption of fibrinogen in a greater proportion in the MPC indicates that the risk of disseminated intravascular coagulation⁴⁸ or the incidents of vascular thrombosis that have been reported for *in vivo* models in NP treatments⁴⁹ could lead to the overestimated predictions of adverse effects in clinical uses. Although there is no current evidence of an association between NPs and disease pathogenesis, NPs could contribute to some pathologies,⁴² and PC profiles could predict adverse effects according to the impairment

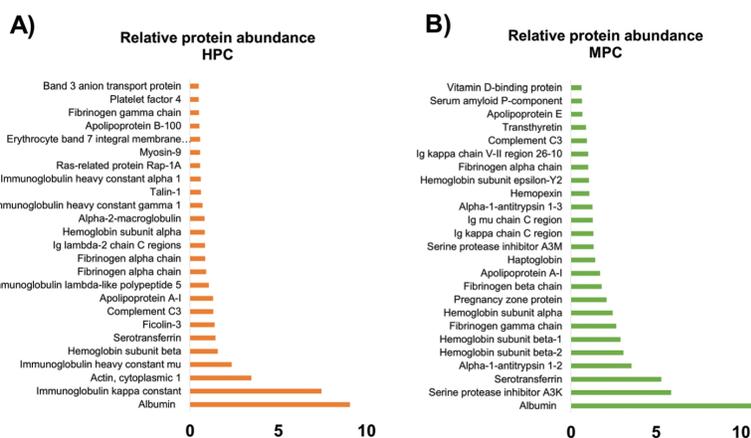


Fig. 5 Relative protein abundance in the HPC and MPC profiles of functionalized SiO₂ NPs. The normalized spectral abundance factor method was used for protein semi-quantification. Relative protein abundance of (A) HPC and (B) MPC.

of protein function. For example, ficolin-3 activates lectin complement pathways, and low levels of ficolin-3 are associated with advanced heart failure.⁵⁰ Decreased alpha-2-macroglobulin, an enzyme that mediates the degradation of amyloid beta, activity is associated with an increased risk of Alzheimer's disease.⁵¹ A reduction of talin has been associated with cardiomyopathy,⁵² and apolipoprotein B is related to hypercholesterolemia and a higher risk of atherosclerosis.⁵³ As protein adsorption influences the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, the PC could determine the biological responses of functionalized SiO₂ NPs, their interactions with biological surfaces, and their biodistribution. However, NP-protein interactions are more complex due to the physicochemical properties of NPs. It is evident that the efforts to develop coatings to decrease protein interactions will never be completely effective, and controlling the biological identity by selectively using protein adsorption could be a strategy to develop safe and efficient NPs. Moreover, our results suggest that the activation of biological processes—such as immune response, metabolism, and cellular transport—could not be found in preclinical studies. Although animal models cannot be replaced to test nanomedicines, these differences should be taken into account in preclinical studies and *in vitro* models when rodent plasma is used. Many animal model studies have been published, but few studies have used and characterized the PC from rat plasma.^{54,55} Therefore, our results suggest that it is always necessary to consider HPC profiles in bionano-interaction studies to corroborate and support the responses found in preclinical studies.

Conclusions

Active therapy promises to be successful in cancer treatment, but its commercialization seems far off because of its low efficiency and safety, as well as its high cost. The main efforts to improve SiO₂ NPs in active therapy are focused on the synthetic identity; however, nanotechnologists need to explore all of the conditions that control the formation of the biological identity, such as the interspecies differences in PC profiles. Our results demonstrate the differences between a HPC and a MPC related to immune response, coagulation, metabolism, and transport. They indicate that these biological processes could not be found in preclinical studies to the same extent as in clinical use. It is evident that HP needs to be part of preclinical studies in order to guarantee a successful translation from animal models to clinical trials. Moreover, controlling protein adsorption could be a strategy for achieving the desired NP selectivity and efficiency.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of the Laboratorio Nacional de Nanoscopia Electrónica-Cinvestav-IPN and Dr Aarón Rojas from Departamento de Química-Cinvestav-IPN. We thank Ismael Sánchez Osorio for the administrative support with the LAICBIO computer cluster. A. Solorio-Rodríguez had a scholarship from CONACYT, No. 262008. This work was financially supported by CONACYT grant Fronteras 2015-2/814.

References

- Z. Li, S. Tan, S. Li, Q. Shen and K. Wang, Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review), *Oncol. Rep.*, 2017, **38**, 611–624.
- M. Mir, S. Ishtiaq, S. Rabia, M. Khatoun, A. Zeb, G. M. Khan, *et al.*, Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery, *Nanoscale Res. Lett.*, 2017, DOI: 10.1186/s11671-017-2249-8.
- A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian and J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *J. Controlled Release*, 2015, **200**, 138–157.
- V. Weissig, T. Pettinger and N. Murdock, Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 4357–4373.
- B. D. Chithrani, A. A. Ghazani and W. C. W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 662–668.
- I. Lynch and K. Dawson, Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today*, 2008, **3**, 40–47.
- C. D. Walkey and W. C. W. Chan, Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2780–2799.
- G. Caracciolo, O. C. Farokhzad and M. Mahmoudi, Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona, *Trends Biotechnol.*, 2017, **35**, 257–264.
- C. Corbo, R. Molinaro, M. Tabatabaei, C. Farokhzad and M. Mahmoudi, Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications, *Biomater. Sci.*, 2017, **5**, 378–387.
- K. Strojjan, A. Leonardi, V. B. Bregar, I. Krizaj, J. Svete and M. Pavlin, Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona, *PLoS One*, 2017, DOI: 10.1371/journal.pone.0169552.
- A. Mebert, C. J. Baglolle, M. F. Desimone and D. Maysinger, Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity, *Food Chem. Toxicol.*, 2017, DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.054.
- K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer and U. S. Schubert, Drug Delivery Poly (ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros

- and Cons as Well as Potential, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6288–6308.
- 13 A. Salvati, A. Pitek, M. Monopoli, K. Prapainop, F. Bombelli, D. Hristov, *et al.*, Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 137–143.
- 14 E. Gammella and P. Buratti, The transferrin receptor: the cellular iron gate, *Metallomics*, 2017, DOI: 10.1039/c7mt00143f.
- 15 K. Zarschler, K. Prapainop, E. Mahon, L. Rocks, M. Bramini, P. M. Kelly, *et al.*, Diagnostic nanoparticle targeting of the EGF-receptor in complex biological conditions using single-domain antibodies, *Nanoscale*, 2014, **6**, 6046–6056.
- 16 W. Stober and A. Fink, Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62–69.
- 17 J. Jiang, G. Oberdörster and P. Biswas, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanopart. Res.*, 2008, **11**, 77–89.
- 18 Y. Li, M. Fujita and D. Boraschi, Endotoxin Contamination in Nanomaterials Leads to the Misinterpretation of Immunotoxicity Results, *Front. Immunol.*, 2017, **8**, 1–7.
- 19 M. P. Monopoli, A. S. Pitek, I. Lynch and K. A. Dawson, Formation and Characterization of the Nanoparticle-Protein Corona, in *Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols*, ed. P. Bergese and K. Hamad-Schifferli, Springer Science+Business Media, New York, 2013, vol. 1025, DOI: 10.1007/978-1-62703-462-3-11.
- 20 Uniprot: the universal protein knowledgebase. Online <http://www.uniprot.org/help/publications>, (accessed February 2017).
- 21 ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal. Online <https://www.expasy.org/>, (accessed February 2017).
- 22 A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm and M. Mann, Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850–858.
- 23 A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. Olsen and M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, 2006, **1**, 2856–2860.
- 24 D. Kessner, M. Chambers, R. Burke, D. Agus and P. Mallick, ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development, *Bioinformatics*, 2008, **24**, 2534–2536.
- 25 J. E. Elias and S. P. Gygi, Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 207–214.
- 26 S. McIlwain, K. Tamura, A. Kertesz-Farkas, C. E. Grant, B. Diamant, B. Frewen, *et al.*, Crux: Rapid Open Source Protein Tandem Mass Spectrometry Analysis, *J. Proteome Res.*, 2014, **13**, 4488–4491.
- 27 M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. Dawson, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 14265–14270.
- 28 A. L. Barrán-Berdón, D. Pozzi, G. Caracciolo, A. L. Capriotti, G. Caruso, C. Cavaliere, *et al.*, Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery, *Langmuir*, 2013, **29**, 6485–6494.
- 29 S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, *et al.*, Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 772–781.
- 30 S. Schöttler, K. Klein, K. Landfester and V. Mailänder, Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake, *Nanoscale*, 2016, **8**, 5526–5536.
- 31 V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi and M. Kraft, Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake, *Biomaterials*, 2016, **75**, 295–304.
- 32 G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti and M. A. Malvindi, Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein-NP Complexes and Influence on the Cellular Response, *ACS Nano*, 2010, **4**, 7481–7491.
- 33 V. Mirshafiee, R. Kim, M. Mahmoudi and M. L. Kraft, The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis in vitro: human plasma vs. human serum, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, **75**, 188–195.
- 34 M. J. Hajipour, S. Laurent, A. Aghaie, F. Rezaee and M. Mahmoudi, Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface, *Biomater. Sci.*, 2014, **2**, 1210–1221.
- 35 V. Colapicchioni, M. Tilio, L. Digiaco, V. Gambini, S. Palchetti, C. Marchini, *et al.*, Personalized liposome – protein corona in the blood of breast, gastric and pancreatic cancer patients, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, **75**, 180–187.
- 36 M. J. Hajipour, J. Raheb, O. Akhavan, S. Arjmand, O. Mashinchian, M. Rahman, *et al.*, Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide, *Nanoscale*, 2015, **7**, 8978–8994.
- 37 J. Zschaler, D. Schlorke and J. Arnhold, Differences in innate immune response between man and mouse, *Crit. Rev. Immunol.*, 2014, **34**, 433–454.
- 38 N. Colclough, L. Ruston, J. M. Wood and P. A. Macfaul, Species differences in drug plasma protein binding, *MedChemComm*, 2014, **5**, 963–967.
- 39 E. Mansfield, K. M. Tyner, C. M. Poling and J. L. Blacklock, Determination of Nanoparticle Surface Coatings and Nanoparticle Purity Using Microscale Thermogravimetric Analysis, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 1478–1484.
- 40 R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, *et al.*, “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf., B*, 2000, **18**, 301–313.

- 41 M. B. Gorbet and M. V. Sefton, Endotoxin: The uninvited guest, *Biomaterials*, 2005, **26**, 6811–6817.
- 42 M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati and K. A. Dawson, Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 779–786.
- 43 Z. J. Deng, M. Liang, M. Monteiro, I. Toth and R. F. Minchin, Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **6**, 39–44.
- 44 S. Mirsadeghi, S. Shansazzadeh, F. Atyabi and R. Dinarvand, Effect of PEGylated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) under magnetic field on amyloid beta fibrillation process, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **59**, 390–397.
- 45 B. Kharazian, N. L. Hadipour and M. R. Eftehadi, Understanding the nanoparticle–protein corona complexes using computational and experimental methods, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, **75**, 162–174.
- 46 M. C. Lo Giudice, L. M. Herda, E. Polo and K. A. Dawson, In situ characterization of nanoparticle biomolecular interactions in complex biological media by flow cytometry, *Nat. Commun.*, 2016, DOI: 10.1038/ncomms13475.
- 47 M. A. Dobrovolskaia, Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy, *J. Controlled Release*, 2016, **220**, 571–583.
- 48 A. Nemmar, S. Albarwani, S. Beegam, P. Yuvaraju, J. Yasin, S. Attoub and B. H. Ali, Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 2779–2789.
- 49 A. Nemmar, S. Al-Salam, S. Beegam, P. Yuvaraju and B. H. Ali, The acute pulmonary and thrombotic effects of cerium oxide nanoparticles after intratracheal instillation in mice, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 2913–2922.
- 50 Z. Horváth, D. Csuka, K. Vargova, S. Lee, L. Varga, P. Garred, *et al.*, Association of Low Ficolin-Lectin Pathway Parameters with Cardiac Syndrome X, *Hum. Immunol.*, 2016, **84**, 174–181.
- 51 M. Zamani, M. Mohammadi, H. Zamani and A. Tavasoli, Pharmacogenetic Study on the Impact of Rivastigmine Concerning Genetic Variants of A2 M and IL-6 Genes on Iranian Alzheimer ' s Patients, *Mol. Neurobiol.*, 2016, **53**, 4521–4528.
- 52 A. M. Manso, H. Okada, F. M. Sakamoto, E. Moreno, S. J. Monkley, R. Li, *et al.*, Loss of mouse cardiomyocyte talin-1 and talin-2 leads to β -1 integrin reduction, costameric instability, and dilated cardiomyopathy, *PNAS*, 2017, DOI: 10.1073/pnas.1701416114.
- 53 L. H. Andersen, A. R. Miserez, Z. Ahmad and R. L. Andersen, Familial defective apolipoprotein B-100: a review, *J. Clin. Lipidol.*, 2016, **10**, 1297–1302.
- 54 S. Kim, J. Hulme, E. Maeng, M. Kim and S. An, Analysis of SiO₂ nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 207–215.
- 55 S. Kim, J. Hulme, E. Maeng, M. Kim and S. An, Analysis of zinc oxide nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 217–224.